

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 242128 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435262**

(22) Data zgłoszenia: **2020.09.11**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.03.14 BUP 11/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.01.16 WUP 03/2023**

(51) MKP:

C12Q 1/22 (2006.01)

A61L 2/08 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**BIBP SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Zator, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

LESZEK MARCIN ŁYSON, Zator, PL

DARIUSZ ŁYSON, Zator, PL

MICHAŁ SZALONEK, Zator, PL

MARIA JOLANTA CHMIEL, Zielonki, PL

(74) Pełnomocnik:

Małgorzata Dominiak, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Sposób oceny skuteczności sterylizacji radiacyjnej opakowań

PL 242128 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu oceny skuteczności sterylizacji radiacyjnej opakowań, w szczególności opakowań typu bag in box.

W procesie produkcji opakowań typu bag in box, przeznaczonych do przechowywania żywności, jednym z kluczowych problemów jest eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Opakowanie typu bag in box stanowi kombinacja opakowania foliowego i kartonowego, przeznaczona do pakowania i przechowywania różnorodnych produktów płynnych i półpłynnych. Ze względu na specyfikę tego typu opakowań rutynowo wykorzystuje się sterylizację metodą radiacyjną. Proces sterylizacji powinien być regularnie walidowany ze względu na ryzyko związane z potencjalną obecnością mikroorganizmów w gotowym produkcie, co może stanowić duży problem dla producenta (np. likwidacja całej partii materiału skażonego mikrobiologicznie), a nawet ryzyko zdrowotne dla konsumentów.

Znane sposoby weryfikacji skuteczności sterylizacji radiacyjnej bazują na zastosowaniu organizmów wskaźnikowych, w szczególności o wysokiej odporności na promieniowanie. Z opisu KR101312613B1 znane jest zastosowanie biologicznego wskaźnika skuteczności sterylizacji radiacyjnej wybranego spośród *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus radiopugnans* lub rekombinowanego *Deinococcus radiodurans* z powodu ich wysokiej odporności na promieniowanie. W opisie ujawniono sposób oceny skuteczności sterylizacji polegający na umieszczeniu fiołki z liofilizowanymi mikroorganizmami w różnej odległości od źródła promieniowania, a następnie kultywacji zawartości fiołek na płytach.

US8945837 opisuje wskaźnik sterylizacji, który zawiera pierwszy przedział z genetycznie modyfikowanym wskaźnikiem biologicznym i drugi przedział, zawierający substrat. Wskaźnik biologiczny zawiera gen, odpowiedni do wytwarzania enzymu wskaźnikowego z substratu z drugiego przedziału. Enzym wskaźnikowy i substrat enzymu są dobrane tak, że działanie enzymu wskaźnikowego na substrat daje wykrywalny sygnał. Po procesie sterylizacji kontaktuje się zawartość pierwszego przedziału z zawartością drugiego przedziału. Braku sygnału potwierdza skuteczność procesu sterylizacji.

US6942989 opisuje sposób oceny żywotności sporów po procesie sterylizacji przy użyciu techniki wielokątowego rozpraszania światła (ang. ultiangl light scattering – MALS), przy użyciu sporów *B. subtilis* i *B. stearothermophilus*. Po procesie sterylizacji ocenia się różnicę między sporami poddanymi sterylizacji i sporami kontrolnymi.

Z opisu WO2019215748A1 znany jest system i sposób sterylizacji i pakowania urządzenia medycznego. Sposób sterylizacji opiera się na zastosowaniu roztworu do sterylizacji, natomiast urządzenie medyczne jest w szczególności stentem i cewnikiem balonowym. Sposób sterylizacji i pakowania urządzenia medycznego polega na dwustopniowej sterylizacji, przy czym sterylizacja wstępna obejmuje sterylizację urządzenia roztworem do sterylizacji, natomiast sterylizacja końcowa obejmuje sterylizację urządzenia w pojemniku i opakowaniu np. przy użyciu gazu np. tlenu etylenu.

Z kolei patent EP2465544B1 ujawnia urządzenie do weryfikacji sterylizacji radiacyjnej, które bazuje na zastosowaniu co najmniej jednego dozymetru. W dokumencie ujawniono również, że dawka promieniowania w miejscu wskaźnikowym może nie być równa dawce w miejscu sterylizacji, dlatego należy wyznaczyć korelację między dawkami w obu miejscach.

Z opisu EP EP1708759A1 znane są sposób i urządzenie do sprawdzania dostarczanej dawki promieniowania w celu uzyskania sterylizacji komponentów, takich jak urządzenia medyczne. Urządzenie bazuje na zastosowaniu dozymetru, natomiast w przedmiotowym sposobie wyznacza się minimalną dawkę promieniowania, zapewniającą pożądany poziom zapewnienia sterylności (SAL), a następnie ustala się korelację między dawką promieniowania, dostarczoną w miejscu umieszczenia dozymetru, a dawką promieniowania w pożądanym miejscu. Na podstawie tej korelacji można następnie wyznaczać dawkę promieniowania, dostarczoną do konkretnego miejsca na podstawie zmierzonej przez dozymetr dawki, w miejscu jego umieszczenia.

Z opisu JPH0523377A znany jest sposób wytwarzania sterylnej gazy, która jest stosowana jako wyrób medyczny. Gazę pakuje się w materiał opakowaniowy, a następnie poddaje się sterylizacji promieniowaniem, np. promieniowaniem gamma. W celu weryfikacji sterylizacji można zastosować bakterie wskaźnikowe, które są znane ze swojej odporności na promieniowanie oraz dozymetr.

Ujawnione w odnalezionych dokumentach sposoby bazują w większości na wykorzystaniu wskaźników biologicznych lub urządzeń pomiarowych (dozymetrów), które wykluczają identyfikację rzeczywistego źródła zanieczyszczenia produktu. Zastosowanie wskaźników pokazuje jedynie jak dany

organizm wskaźnikowy reaguje na dany sposób sterylizacji, natomiast nie uwzględnia faktu, że populację mikroorganizmów, występujących w obszarze produkcyjnym, charakteryzuje duża dynamika zmian, mają one odmienne źródła pochodzenia, różne właściwości i mogą się charakteryzować nabyciem wysokiej odporności na promieniowanie. Ponadto populacje mikroorganizmów endemicznych mogą się różnić w zależności od środowiska produkcji. Cytowane powyżej sposoby weryfikacji sterylizacji radiacyjnej, bazujące na zastosowaniu wskaźników, nie uwzględniają potencjalnego ryzyka dla powodzenia sterylizacji radiacyjnej ze strony populacji mikroorganizmów endemicznych, występujących w danym obszarze produkcyjnym.

Celem wynalazku było opracowanie nowego sposobu oceny skuteczności procesu radiacji w oparciu o przeżywalność endemicznych mikroorganizmów testowych, wyizolowanych ze środowiska produkcyjnego – powietrza, powierzchni roboczych i ścian zakładu produkcyjnego i materiałów używanych do produkcji opakowań np. folii i korków.

Sposób oceny skuteczności sterylizacji radiacyjnej opakowań, w szczególności opakowań typu bag in box, według wynalazku zawiera następujące kroki:

- a) pobranie co najmniej jednej próbki materiału mikrobiologicznego z co najmniej fragmentu powierzchni opakowania przeznaczonego do sterylizacji radiacyjnej i/albo z powietrza wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań i/albo z co najmniej jednej powierzchni wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań, przy czym powierzchnia wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań jest wybrana spośród powierzchni ścian, podłóg, sufitu i powierzchni roboczych wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań,
- b) przeniesienie materiału mikrobiologicznego pobranego w kroku a) na co najmniej jedno podłoże, odpowiednie do hodowli bakterii i/albo grzybów, oraz hodowla pobranego materiału mikrobiologicznego w celu uzyskania endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, należących do bakterii i/albo grzybów,
- c) wyizolowanie czystych kultur endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, spośród wyhodowanych kolonii, które dominowały wśród endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, otrzymanych w kroku b)
- d) identyfikacja przynależności systematycznej wyizolowanych czystych kultur endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego z kroku c) oraz wybór od 3 do 10 izolatów spośród czystych kultur endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, które są znane jako biologicznie szkodliwe lub stwarzają potencjalne zagrożenie dla produktów na podstawie ich przynależności systematycznej
- e) przygotowanie co najmniej pięciu zestawów testowych, przy czym pojedynczy zestaw testowy przygotowuje się poprzez przeniesienie na wspólne podłoże testowe, stanowiące wodę zestaloną agar, co najmniej trzech izolatów wybranych w kroku d), przy czym pojedyncze wspólne podłoże testowe zawiera wszystkie wybrane izolaty, tworząc zestaw testowy
- f) umieszczenie co najmniej pięciu zestawów testowych we wnętrzu opakowania zbiorczego, zawierającego co najmniej jedno opakowanie przeznaczone do sterylizacji radiacyjnej, przy czym zestawy testowe umieszcza się tak, że co najmniej jeden zestaw testowy jest umieszczony w odległości nie mniejszej niż 15 cm od najbliższej krawędzi opakowania zbiorczego
- g) poddanie opakowania zbiorczego sterylizacji radiacyjnej
- h) ocena przeżywalności izolatów z zestawów testowych po procesie sterylizacji radiacyjnej poprzez przeniesienie każdego z izolatów z każdego z zestawów testowych po sterylizacji radiacyjnej na podłoże hodowlane, odpowiednie do jego hodowli i hodowla izolatu, a następnie stwierdzenie wzrostu albo braku wzrostu izolatu.

Korzystnie, powierzchnia opakowania przeznaczonego do sterylizacji radiacyjnej jest powierzchnią zewnętrzną lub wewnętrzną opakowania lub korkiem do zamykania opakowania.

W kroku d) identyfikacji drobnoustrojów można dokonać metodą biochemiczną lub techniką spektrometrii mas MALDI TOF lub sekwencjonowaniem DNA, korzystnie sekwencjonowaniem nowej generacji NGS.

W kroku e) do zestawu testowego można dodać szczep *Escherichia coli* ATCC25922.

Jeśli w środowisku zakładu produkcyjnego opakowań zostanie stwierdzona obecność izolatu o nieoznaczonej przynależności systematycznej, można go dodać do zestawu testowego w kroku e).

Korzystnie, w kroku f) w opakowaniu zbiorczym umieszcza się między 5 a 30 zestawów testowych.

W kroku a) próbkę materiału mikrobiologicznego z co najmniej fragmentu powierzchni opakowania przeznaczonego do sterylizacji radiacyjnej można pobrać przez wyplukiwanie.

Najlepiej gdy w kroku e) jako podłoże testowe stosuje się wodę destylowaną zestaloną agarem, przy czym stężenie agaru w podłożu testowym wynosi 15 g/L.

W kroku f) wszystkie zestawy testowe można rozmieścić w opakowaniu zbiorczym w taki sposób, aby wszystkie zestawy testowe znajdowały się w odległości co najmniej 15 cm od najbliższej krawędzi opakowania zbiorczego.

Wykorzystanie drobnoustrojów endemicznych, izolowanych ze środowiska produkcji jest nowatorską metodą walidacji skuteczności sterylizacji opakowań metodą radiacyjną. Populację mikroorganizmów występujących w obszarze produkcyjnym charakteryzuje duża dynamika zmian, mają one odmienne źródła pochodzenia, różne właściwości i mogą charakteryzować się wysoką odpornością na promieniowanie – co może być przyczyną skażenia produktu nawet po procesie radiacji. W przypadku wystąpienia zakażenia mikrobiologicznego w opakowaniu bag in box, zawierającym gotowy produkt, na podstawie przynależności systematycznej mikroorganizmu powodującego zakażenie możliwe jest wykluczenie powstania zakażenia na etapie sterylizacji radiacyjnej. Opracowana procedura może podlegać modyfikacji poprzez wprowadzanie jako organizmów testowych drobnoustrojów potencjalnie skażających opakowania, występujących w dowolnym zakładzie produkcyjnym, dając tym samym pewność ich eliminacji z produktu. Zaletą opracowanej metody jest możliwość wykorzystania różnych mikroorganizmów (bakterie, grzyby pleśniowe, drożdże, promieniotwórcy) w zależności od potrzeb producenta i składu populacji drobnoustrojów izolowanych z zakładu.

Wynalazek przedstawiono w przykładach wykonania na rysunku, na którym: fig. 1 przedstawia schematycznie technikę posiewu redukcyjnego wybranej kolonii bakterii, rosnącej na pożywce TSA, fig. 2 przedstawia schematycznie technikę posiewu punktowego wybranej kolonii grzybów, rosnącej na pożywce MEA, fig. 3 przedstawia schemat przeniesienia krążków z organizmami testowymi na płytki z 1,5% agarem, przy czym 1 – *Escherichia coli* ATCC25922, 2 – *Staphylococcus hominis*, 3 – *Bacillus licheniformis*, 4 – *Micrococcus luteus*, 5 – *Penicillium glabrum*, 6 – *Cladosporium cladosporioides*, 7 – *Aspergillus fumigatus*, 8 – *Aspergillus niger*, 9 – *Streptomyces* sp., 10 – *Saccharomyces cerevisiae*, fig. 4 przedstawia przygotowaną do radiacji szalkę z krążkami testowymi z fig. 3, fig. 5 przedstawia A) rozmieszczenie zestawów testowych w opakowaniu zbiorczym o małych gabarytach (600x800x320 mm), B) stos dziesięciu opakowań zbiorczych o małych gabarytach, umieszczonych na europalecie, przy czym stos ma wymiar (bez europalety) 1650 mm x 1210 mm x 810 mm, fig. 6 przedstawia A) rozmieszczenie zestawów testowych w opakowaniu zbiorczym o bardzo dużych gabarytach – 800 mm x 1200 mm x 760 mm, B) stos dwóch opakowań zbiorczych o bardzo dużych gabarytach, umieszczonych na europalecie, przy czym stos ma wymiar (bez europalety) 1645 mm x 1200 mm x 800 mm fig. 7 przedstawia przeniesienie krążka z szalki z fig. 4 na właściwą pożywkę, fig. 8 przedstawia wzrost mikroorganizmów testowych z zestawu kontrolnego (od lewej *Penicillium glabrum*, *Saccharomyces cerevisiae*), fig. 9 przedstawia brak wzrostu mikroorganizmów z zestawu poddanego radiacji (górny rząd, od lewej: *Cladosporium cladosporioides*, *Escherichia coli*, dolny rząd od lewej: *Staphylococcus hominis*, *Saccharomyces cerevisiae*).

Przykład 1

a–b) Pobranie próbek materiału biologicznego i hodowla pobranego materiału mikrobiologicznego w celu uzyskania endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego

Aby wybrać mikroorganizmy testowe, przeprowadzono badania czystości mikrobiologicznej powierzchni, powietrza i opakowań przez sterylizacją.

– Badania zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza

Próbki bioaerozolu na każdym z badanych stanowisk pomiarowych pobierane były przy użyciu 6-stopniowego impaktora Andersena – model 10-710, Graseby- Andersen, Inc., Atlanta, GA, USA, w trzech powtórzeniach w każdym punkcie pomiarowym. Aparat umieszczano na wysokości 0,5–1,0 m nad podłogą lub gruntem (pomiarzy zewnętrzne) w celu pobrania próbek ze strefy z której najwięcej zanieczyszczeń może przedostawać się do produktu końcowego. Zastosowano 5-minutowy czas poboru aerozoli bakteryjnych i grzybowych. Probki pobierano przy prędkości przepływu 28,3 dm³·min⁻¹. W ostatniej serii badań wykonano równoległe badania powietrza z wykorzystaniem aeroskopu MAS100 firmy Merck.

Do hodowli mikroorganizmów zastosowano następujące podłoża mikrobiologiczne: agar tryptowo-sojowy (TSA LAB-AGARTM, Biomaxima) dla bakterii oraz agar słodowy (Malt Extract Agar, Biomaxima) dla grzybów (pleśniowych i drożdży).

Płytki z TSA inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 35±2°C a następnie przez 72 godziny w 20±2°C. Płytki z MEA inkubowano 96 godzin w 25°C. Przedłużona inkubacja hodowli drobnoustrojów

miała na celu umożliwienie wzrostu szczepom rosnącym wolno w niższym zakresie temperatur – jednak już od pierwszego (dla bakterii) i od trzeciego (dla grzybów) dnia inkubacji co 24 godziny zliczano wyrosłe kolonie mikroorganizmów. Po okresie inkubacji płytek przeprowadzono analizę ilościową wyrosłych mikroorganizmów. Stężenie bioaerozolu obliczono jako liczbę jednostek tworzących kolonie na metr sześcienny powietrza ($\text{jtk} \cdot \text{m}^{-3}$) osobno dla każdej z badanych grup mikroorganizmów.

Do celów analizy jakościowej (diagnostyki) izolowano dominujące szczepy bakterii i grzybów różniące się cechami makroskopowymi.

– Badania mikrobiologicznego zanieczyszczenia powierzchni

Ocenię mikrobiologicznego zanieczyszczenia powierzchni ścian i powierzchni roboczych (pionowych i poziomych) przeprowadzono metodą płytek kontaktowych. W tym celu wykorzystano płytki Count Tact typu Rodac o średnicy 55 cm firmy Biomaxima oraz aplikator Count Tact firmy Bio Mérieux. Badanie wykonano zgodnie z procedurą firmy Bio Mérieux oraz PN – ISO 18593:2005 i Nowaczyk i Merlak 2014. (Nowaczyk P., Merlak D. 2014. Badania mikrobiologiczne powierzchni – kryteria oceny i metodyka badań. Świat przemysłu kosmetycznego. 1, 64–67., PN – ISO 18593:2005 Mikrobiologia żywności i pasz.

Horyzontalne metody pobierania próbek z powierzchni z użyciem płytek kontaktowych i wymazów)

Do hodowli mikroorganizmów zastosowano następujące podłoża mikrobiologiczne: agar tryptowo-sojowy (TSA LAB-AGARTM, Biomaxima) dla bakterii oraz agar słodowy (Malt Extract Agar, Biomaxima) oraz podłoże Sabouraud (Biomaxima) dla grzybów.

Płytki z TSA inkubowano przez 24 godziny w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$ a następnie przez 72 godziny w $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Płytki z podłożami dla grzybów inkubowano 96 godzin w 25°C . Przedłużona inkubacja hodowli drobnoustrojów miała na celu umożliwienie wzrostu szczepom rosnącym wolno w niższym zakresie temperatur

– jednak już od pierwszego (dla bakterii) i od trzeciego (dla grzybów) dnia inkubacji co 24 godziny zliczano wyrosłe kolonie mikroorganizmów.

Wyniki badań zanieczyszczenia mikrobiologicznego powierzchni podano w przeliczeniu na powierzchnię płytki 25 cm^2 ($\text{jtk} \cdot \text{CT}^{-1}$) (jtk = jednostki tworzące kolonie; CT = płytka kontaktowa Count Tact typu Rodac, średnica 55cm) [PN-A- 82055–19:2000, PN – ISO 18593:2005, Nowaczyk i Merlak 2014, Rozp. Min. Zdrowia 2015].

Do celów analizy jakościowej (diagnostyki) izolowano dominujące szczepy bakterii i grzybów różniące się cechami makroskopowymi.

– Badanie worków bag in box

Do badań zanieczyszczenia mikrobiologicznego worków wybrano partie opakowań wytworzonych w różnych terminach i różnych warunkach. Uwzględniono produkty wytworzone w różnych warunkach produkcyjnych.

Worki przeznaczone do badań mikrobiologicznych pobierano losowo w dniach kontroli czystości powietrza na hali produkcyjnej oraz w komorze tymczasowej przed lub po procesie ozonowania, metodą losową. Do badań dostarczono również worki wyprodukowane w innych terminach (przed dezynfekcją hali) oraz worki poddane procesowi sterylizacji.

W celu wykonania mikrobiologicznej analizy ilościowej zastosowano zmodyfikowaną metodę wypłukiwania (popłuczyn) [Żakowska i Stobińska 2000].

Podłoża oraz odczynniki przygotowano zgodnie z wytycznymi producenta na opakowaniach. Gotowe podłoża rozlano ilościowo na szalki polistyrenowe.

Badane worki napełniono roztworem jałowej soli fizjologicznej (0,85% roztwór wodny NaCl) w warunkach jałowych. Do każdego opakowania wlało przez kołnierz sól fizjologiczną o objętości odpowiadającej 10% pojemności worka. Następnie zamknięto wylot kołnierza zaworem. Napełnione worki wytrząsano w temperaturze pokojowej (22°C) przez 24 godziny w celu przeniesienia drobnoustrojów z wewnętrznej powierzchni do roztworu soli fizjologicznej. Po całonocnym wytrząsaniu, zawartość worka przefiltrowano przy użyciu zestawu do filtracji membranowej. Na nasadce z podstawą filtra umieszczono sączonek membranowy (cellulose nitrate filter $0,45 \mu\text{m}$, firmy Sartorius) i całość soli fizjologicznej z worka przelano do jałowego lejka zestawu do filtracji. Zawartość opakowania opróżniono poprzez odcięcie rogu worka, w celu uniknięcia wtórnego zakażenia mogącego pochodzić z zaworu. Po zakończeniu filtracji sączonek membranowy umieszczono na szalce Petriego z odpowiednim podłożem. Dla każdej kolejnej próbki przeprowadzono tę samą procedurę. Analizę każdej partii worków wykonano każdorazowo minimum w trzech powtórzeniach dla każdej grupy mikroorganizmów. Do hodowli w warunkach

beztlenowych wykorzystano zestawy firmy Biomerieux. Analizy każdej partii wykonywano w trzech seriach. [Pepper i Gerba 2004; PN-EN ISO 9308-1:2004/AC:2009].

W ramach badań określano liczebność bakterii tlenowych i beztlenowych, grzybów (pleśni i drożdży), bakterii grupy coli oraz bakterii grupy coli typu fekalnego (*Escherichia coli*).

T a b e l a 1. Warunki hodowli drobnoustrojów izolowanych z worków

Badana grupa mikroorganizmów	Podłoże	Temperatura [°C]	Czas inkubacji [h]
Bakterie tlenowe	Agar krwawy (Biomaxima)	35±2	24
	TSA (Biomaxima)	20±2	72
Bakterie beztlenowe	Agar krwawy (Biomaxima)	35±2	24
	TSA (Biomaxima)	20±2	72
Grzyby (pleśnie i drożdże)	MEA (Biomaxima)	25±2	96
Bakterie grupy coli	Agar ENDO (Biomaxima)	35±2	24
<i>Escherichia coli</i>	TBX (Biomaxima)	44	24

Przedłużona inkubacja hodowli drobnoustrojów miała na celu umożliwienie wzrostu szczepom rosnącym wolno w niższym zakresie temperatur – jednak już od pierwszego (dla bakterii) i od trzeciego (dla grzybów) dnia inkubacji co 24 godziny zliczano wyrosłe kolonie mikroorganizmów.

Po zakończeniu inkubacji, wyniki przeliczono i wyrażono w postaci liczby jednostek tworzących kolonie na 1 m² wewnętrznej powierzchni worka.

Do celów analizy jakościowej (diagnostyki) izolowano dominujące szczepy bakterii i grzybów różniące się cechami makroskopowymi.

c) Wyizolowanie czystych kultur drobnoustrojów, które dominowały wśród wyhodowanych mikroorganizmów

Po przeprowadzeniu badania czystości mikrobiologicznej powierzchni, powietrza oraz opakowań wyizolowano czyste kultury drobnoustrojów, które dominowały wśród wyhodowanych mikroorganizmów. Bakterie, drożdże i promieniowce izolowano metodą powierzchniowych posiewów redukcyjnych na podłożu ogólnym do hodowli bakterii TSA – Trypticase-Soy-Agar (agar tryptozowo-sojowy) zgodnie z Fig. 1. W przypadku grzybów pleśniowych zastosowano posiew punktowy – zgodnie z Fig. 2.

d) Określenie przynależności systematycznej izolatów

Celem wstępnej identyfikacji wyhodowanych drobnoustrojów, wyizolowano czyste kultury z hodowli różniących się makroskopowo i wykonano preparaty, które umożliwiły określenie podstawowych cech mikroskopowych mikroorganizmów. W przypadku bakterii wykonano barwienie metodą Grama w celu oznaczenia przynależności systematycznej grzybów przygotowano preparaty przyżyciowe [Grzybowski i Reiss 2001, Krzyściak i in. 2011]. Do celów diagnostycznych wyizolowano około 250 szczepów.

Dokładna identyfikacja drobnoustrojów została wykonana metodą spektroskopii masowej (MALDI TOF MS), z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej, wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu,

przy pomocy analizatora MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, Germany). Wykonywanie identyfikacji poprzedzał etap wstępnej ekstrakcji białek z użyciem etanolu i kwasu mrówkowego. W tym celu niewielką ilość 24 godzinnej hodowli badanego drobnoustroju zawieszano w 300 μ l jałowej wody dejonizowanej, po czym dodawano 900 μ l czystego etanolu (POCH, Polska) i dokładnie mieszano z użyciem wortexu. W kolejnym etapie próbkę wirowano przez 2 minuty przy obrotach 13000 rpm/min. Po odrzuceniu supernatantu, do uzyskanego osadu dodawano kolejno: 50 μ l 70% wodnego roztworu kwasu mrówkowego i 50 μ l acetonitrylu (Fluka Analytical), po czym dokładnie mieszano z użyciem wortexu. Po ponownym odwirowaniu (13000 rpm/min przez 2 min) pobierano 1 μ l supernatantu, który nakładano na metalową płytkę i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Następnie nakładano po 1 μ l roztworu matrycy i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Metalową płytkę z nałożonymi próbkami umieszczano w komorze pomiarowej aparatu MALDI Biotyper, usuwano powietrze celem uzyskania próżni i poddawano działaniu promienia laserowego. Pod jego wpływem dochodziło do desorpcji i jonizacji białek bakteryjnych, następnie zjonizowane peptydy przyspieszano w silnym polu elektrycznym i mierzono czas przelotu jonów (Tof; time of flight). W oparciu o otrzymywany rozkład peptydów według masy cząsteczkowej, ładunku oraz zróżnicowanego czasu przelotu, system MALDI-TOF MS automatycznie generował spektrometryczne widma pików odpowiadających jonom o różnym stosunku masy do ładunku oraz analizował ilość, intensywność i korelację pików, a także porównywał badane widmo z widmami referencyjnymi drobnoustrojów. Automatyczny pomiar widma i jego analiza porównawcza z widmami wzorcowymi drobnoustrojów były wykonane przez spektrometr masowy Ultraflexxtreme w połączeniu z programem MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik, Niemcy), zawierający w bazie danych 3672 profili drobnoustrojów. W oparciu o ten program określono również spektralny profil białkowy wybranego drobnoustroju. Prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji w systemie MALDI Biotyper 3.0 wyrażane było w postaci wskaźnika punktowego: 2,300–3,000 wiarygodna identyfikacja drobnoustroju do poziomu gatunku; 2,000–2,299 wiarygodna identyfikacja drobnoustroju do poziomu rodzaju oraz prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu gatunku; 1,700–1,999 wskazywała na prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu rodzaju; 0–1,699 to niewiarygodny wynik identyfikacji [Kosikowska i in. 2015, Singhal i in. 2015].

Kilkunastu izolatów nie udało się wiarygodnie zidentyfikować – były to głównie szczepy grzybów pleśniowych.

e) Przygotowanie zestawów testowych

Do zestawów testowych wybrano izolaty występujące powszechnie w środowisku produkcji i workach w trakcie prowadzonych badań, zaliczone do czynników biologicznie szkodliwych na stanowiskach pracy – *Aspergillus fumigatus* lub stwarzające potencjalne zagrożenie dla produktów (szczególnie soków) nalewanych do worków przez wielu odbiorców – *Saccharomyces cerevisiae*. Wybrano następujące izolaty:

Bakterie: *Staphylococcus hominis*, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* ATCC25922 – szczep wzorcowy powszechnie uznawany za wskaźnik złego stanu higienicznego

Promieniowce (actinobakterie): *Streptomyces* sp.

Grzyby:

– Pleśniowce: *Penicillium glabrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*

– Drożdże: *Saccharomyces cerevisiae*

Wybrane szczepy przesiano na odpowiednie pożywki metodą powierzchniową (murawą) i inkubowano zgodnie z parametrami zestawionymi w tab. 2 uwzględniając różne czasy hodowli.

T a b e l a 2. Zalecane warunki inkubacji drobnoustrojów testowych

Badana grupa mikroorganizmów	Podłoże*	Temperatura [°C]	Czas inkubacji [h]
Bakterie	TSA (Trypticase Soy Agar - agar tryptozowo-sojowy)	35±2	48
Grzyby (pleśnie i drożdże)	MEA (Malt Extract Agar - agar maltozowy)	25±2	5 dni
Promieniowce	ACM (Actinomycetes Cultivation Medium – podłoże hodowlane dla promieniowców)	25±2	7 dni

* - można zastosować dowolne podłoże zapewniające wzrost mikroorganizmów testowych

Pożywki stosowane na każdym etapie testów rozlewano sterylnie na szalki Petriego ilościowo.

Na szalki o średnicy 90 mm wylano po 20 cm³ podłoża – wody zestalonej 1,5% agarem. Na tak przygotowane szalki naniesiono krążki średnicy 5 mm wycięte z hodowli na których wcześniej wykonano posiew w postaci murawy (Fig. 3 i 4). Zastosowanie uboższego podłoża zapobiegło wzrostowi mikroorganizmów w czasie transportu materiału do/z radiacji i jednocześnie zapobiegło wysuszeniu naniesionych drobnoustrojów. Zastosowanie wspólnego podłoża testowego dla wszystkich szczepów jednocześnie miało na celu dostarczenie wszystkim szczepom z danego zestawu testowego tej samej dawki promieniowania podczas radiacji.

f) Umieszczenie zestawów testowych w opakowaniach zbiorczych, przeznaczonych do radiacji

Przygotowane zestawy testowe zaklejono parafilmem i dodatkowo włożono indywidualnie w woreczki strunowe w celu wykluczenia ewentualnej kontaminacji jałowionych opakowań i zabezpieczenia hodowli przed zakażeniem bądź uszkodzeniem.

Zestawy testowe przygotowano na 24 godziny przed planowaną radiacją (wysyłką do radiacji) a do czasu umieszczenia ich w opakowaniach zbiorczych przechowywano w temperaturze 4°C.

Umieszczając zestawy testowe w opakowaniach zbiorczych ustalono ich rozkład w kartonie, biorąc pod uwagę jego wielkość i uwzględniając różne płaszczyzny oraz odległości od źródła promieniowania w czasie procesu sterylizacji.

W opakowaniu zbiorczym o małych gabarytach umieszczono 9 zestawów testowych (Fig. 5A) przy czym jeden zestaw testowy znajdował się w połowie wysokości opakowania zbiorczego. W opakowaniu o bardzo dużych gabarytach umieszczono 27 zestawów testowych, przy czym 9 zestawów testowych zostało równomiernie rozmieszczonych na płaszczyźnie w połowie wysokości opakowania i wszystkie zestawy testowe znajdowały się w odległości nie mniejszej niż 15 cm od krawędzi opakowania (Fig. 6A). Opakowania zbiorcze umieszczono w stosach na europaletach (fig. 5B i 6B).

g) Poddanie opakowań zbiorczych sterylizacji radiacyjnej

Proces sterylizacji opakowań zbiorczych przeprowadzono przy użyciu metody z wykorzystaniem promieniowania gamma, którego źródłem był izotop kobaltu (Co60). Założono dwa zakresy promieniowania jonizującego, które dozymetrycznie sprawdzono. Ilość pochłoniętego promieniowania gamma dla pierwszego zakresu wynosiła od 7 do 15 kGy (dawka dla produktów ultra clean), dla drugiego zakresu od 15 do 35 kGy (dawka standardowo dla opakowań do rozlewu aseptycznego).

h) Ocena przeżywalności mikroorganizmów po procesie radiacji

Po wyjęciu próbek biologicznych z opakowań zbiorczych, które zostały poddane radiacji, krążki z organizmami testowymi przeniesiono w sposób jałowy na odpowiadające danym drobnoustrojom pożywki hodowlane (Fig. 7) rozlane na szalki o małej średnicy (35, 55 mm). Stronę z hodowlą lekko docisano do podłoża. Całość inkubowano zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabeli 2. Jako kontroli

użyto drobnoustrojów z zestawu testowego, który nie został poddany procesowi radiacji i był przechowywany w temperaturze pokojowej. Interpretacji wyniku dokonano w oparciu o wzrost/brak wzrostu mikroorganizmów z krążków po przeniesieniu ich na podłoże hodowlane. We wszystkich przypadkach organizmy testowe pochodzące z zestawu testowego kontrolnego wykazały wzrost (Fig. 8). Po skutecznej sterylizacji wszystkie organizmy testowe pochodzące z zestawów testowych poddanych procesowi radiacji nie wykazały wzrostu (Fig. 9).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oceny skuteczności sterylizacji radiacyjnej opakowań, w szczególności typu bag in box, **znamienny tym**, że zawiera następujące kroki:
 - a) pobranie co najmniej jednej próbki materiału mikrobiologicznego z co najmniej fragmentu powierzchni opakowania przeznaczonego do sterylizacji radiacyjnej i/albo z powietrza wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań i/albo z co najmniej jednej powierzchni wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań, przy czym powierzchnia wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań jest wybrana spośród powierzchni ścian, podłóg, sufitu i powierzchni roboczych wewnątrz zakładu produkcyjnego opakowań,
 - b) przeniesienie materiału mikrobiologicznego pobranego w kroku a) na co najmniej jedno podłoże, odpowiednie do hodowli bakterii i/albo grzybów, oraz hodowla pobranego materiału mikrobiologicznego w celu uzyskania endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, należących do bakterii i/albo grzybów,
 - c) wyizolowanie czystych kultur endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, spośród wyhodowanych kolonii, które dominowały wśród endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, otrzymanych w kroku b)
 - d) identyfikacja przynależności systematycznej wyizolowanych czystych kultur endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego z kroku c) oraz wybór od 3 do 10 izolatów spośród czystych kultur endemicznych mikroorganizmów zakładu produkcyjnego, które są znane jako biologicznie szkodliwe lub stwarzają potencjalne zagrożenie dla produktów na podstawie ich przynależności systematycznej
 - e) przygotowanie co najmniej pięciu zestawów testowych, przy czym pojedynczy zestaw testowy przygotowuje się poprzez przeniesienie na wspólne podłoże testowe, stanowiące wodę zestaloną agar, co najmniej trzech izolatów wybranych w kroku d), przy czym pojedyncze wspólne podłoże testowe zawiera wszystkie wybrane izolaty, tworząc zestaw testowy.
 - f) umieszczenie co najmniej pięciu zestawów testowych we wnętrzu opakowania zbiorczego, zawierającego co najmniej jedno opakowanie przeznaczone do sterylizacji radiacyjnej, przy czym zestawy testowe umieszcza się tak, że co najmniej jeden zestaw testowy jest umieszczony w odległości nie mniejszej niż 15 cm od najbliższej krawędzi opakowania zbiorczego
 - g) poddanie opakowania zbiorczego sterylizacji radiacyjnej
 - h) ocena przeżywalności izolatów z zestawów testowych po procesie sterylizacji radiacyjnej poprzez przeniesienie każdego z izolatów z każdego z zestawów testowych po sterylizacji radiacyjnej na podłoże hodowlane, odpowiednie do jego hodowli i hodowla izolatu, a następnie stwierdzenie wzrostu albo braku wzrostu izolatu.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że powierzchnia opakowania przeznaczonego do sterylizacji radiacyjnej jest powierzchnią zewnętrzną lub wewnętrzną opakowania lub korkiem do zamykania opakowania.
3. Sposób według zastrzeżenia 1 albo 2, **znamienny tym**, że w kroku d) identyfikacji drobnoustrojów dokonuje się metodą biochemiczną lub techniką spektrometrii mas MALDI TOF lub sekwencjonowaniem DNA, korzystnie sekwencjonowaniem nowej generacji NGS.
4. Sposób według zastrzeżenia 1 albo 2 albo 3, **znamienny tym**, że w kroku e) do zestawu testowego dodaje się szczep *Escherichia coli* ATCC25922.
5. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że w kroku e) do zestawu testowego dodaje się izolat o nieoznaczonej przynależności systematycznej, występujący w środowisku zakładu produkcyjnego.

6. Sposób według któregokolwiek z zastrz. od 1 do 5, **znamienny tym**, że w kroku f) w opakowaniu zbiorczym umieszcza się między 5 a 30 zestawów testowych.
7. Sposób według któregokolwiek z zastrz. od 1 do 6, **znamienny tym**, że w kroku a) próbkę materiału mikrobiologicznego z co najmniej fragmentu powierzchni opakowania przeznaczonego do sterylizacji radiacyjnej pobiera się przez wypłukiwanie.
8. Sposób według któregokolwiek z zastrz. od 1 do 7, **znamienny tym**, że w kroku e) jako podłoże testowe stosuje się wodę destylowaną zestaloną agarem, przy czym stężenie agaru w podłożu testowym wynosi 15 g/L.
9. Sposób według któregokolwiek z zastrz. od 1 do 8, **znamienny tym**, że w kroku f) wszystkie zestawy testowe umieszcza się tak, że podczas procesu sterylizacji wszystkie zestawy testowe są umieszczone w odległości nie mniejszej niż 15 cm od najbliższej krawędzi opakowania zbiorczego.

Rysunki

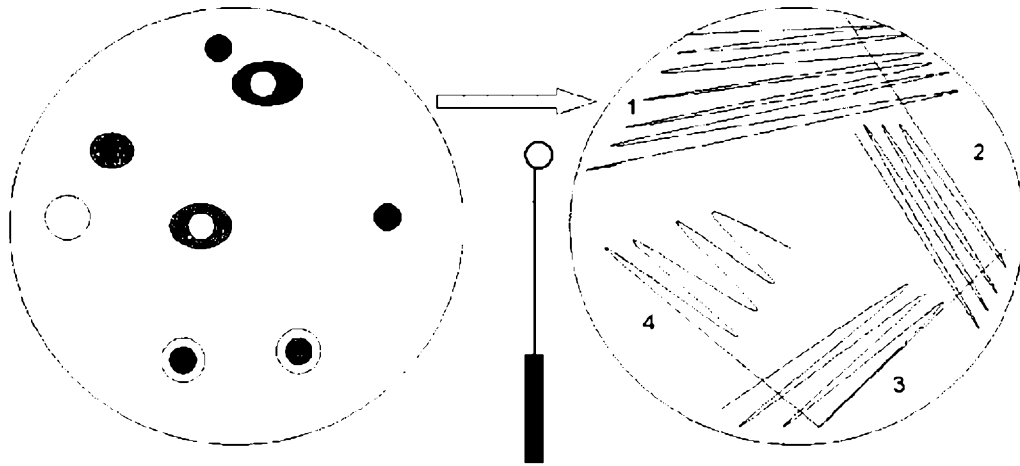


Fig 1

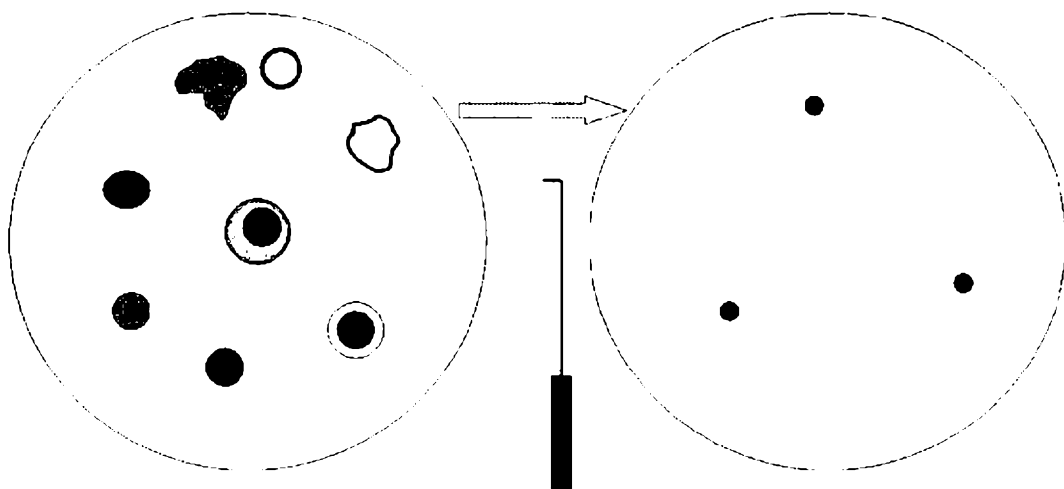


Fig.2

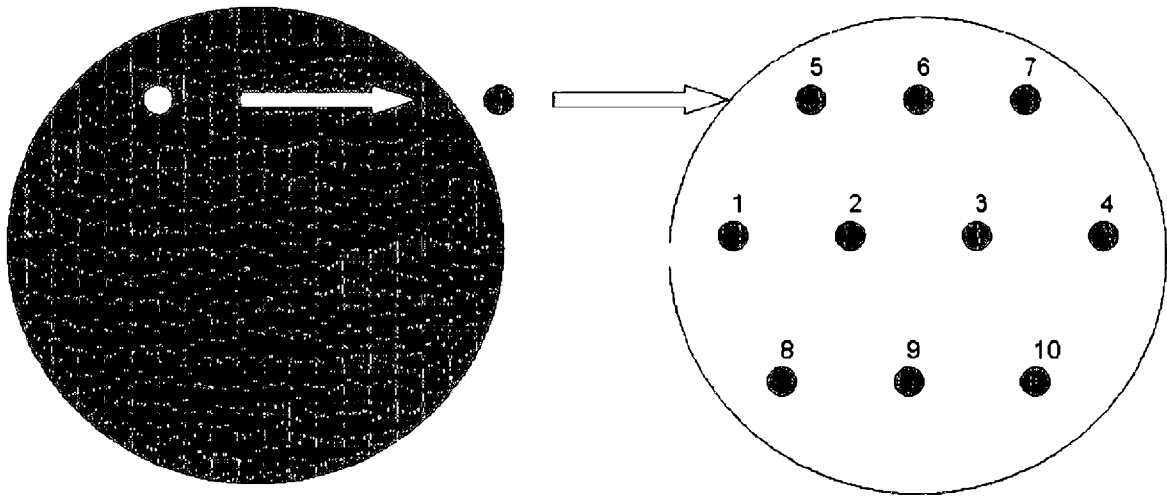


Fig. 3

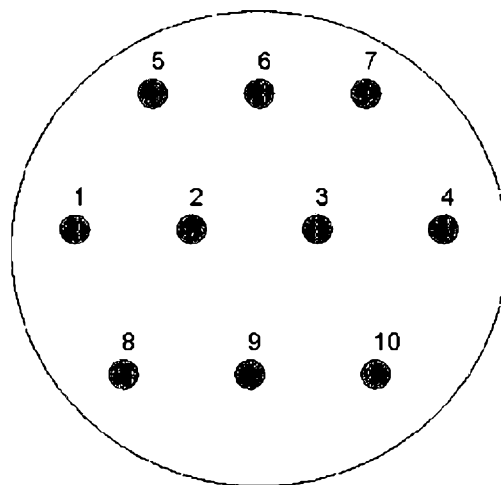


Fig. 4

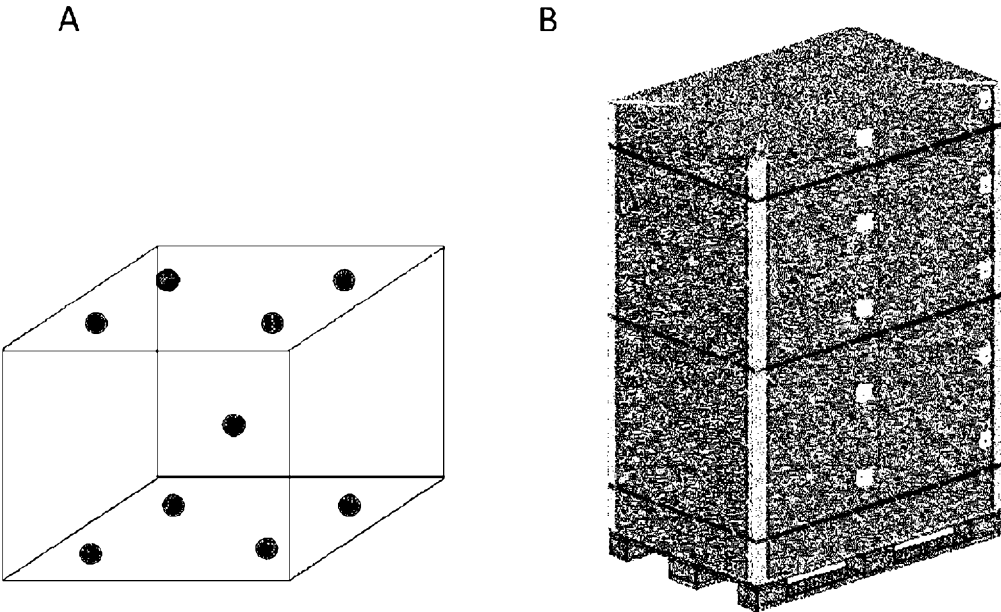


Fig. 5

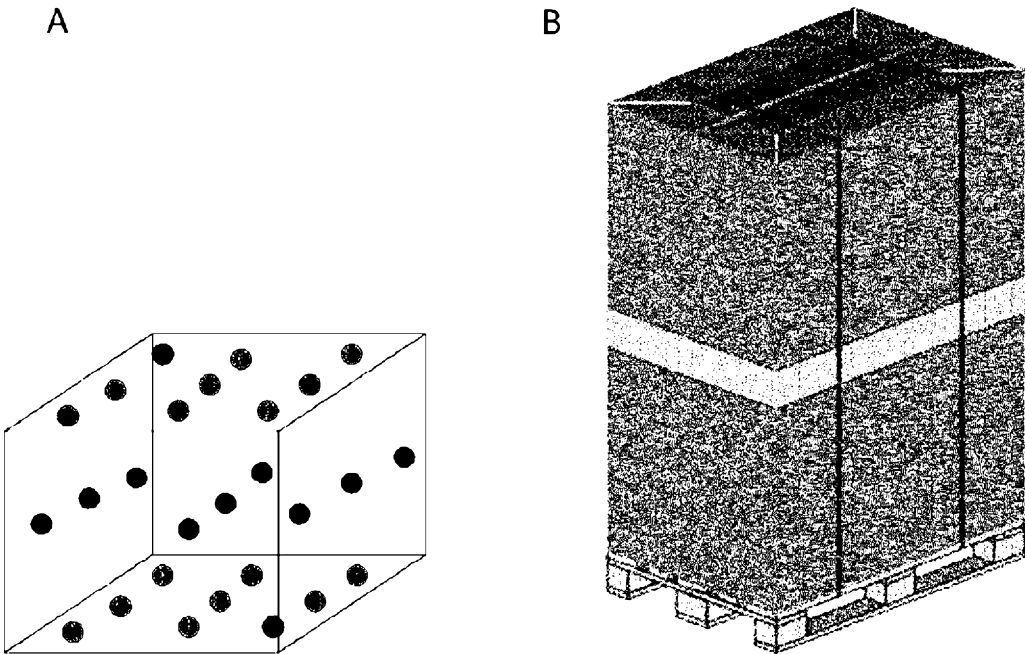


Fig. 6

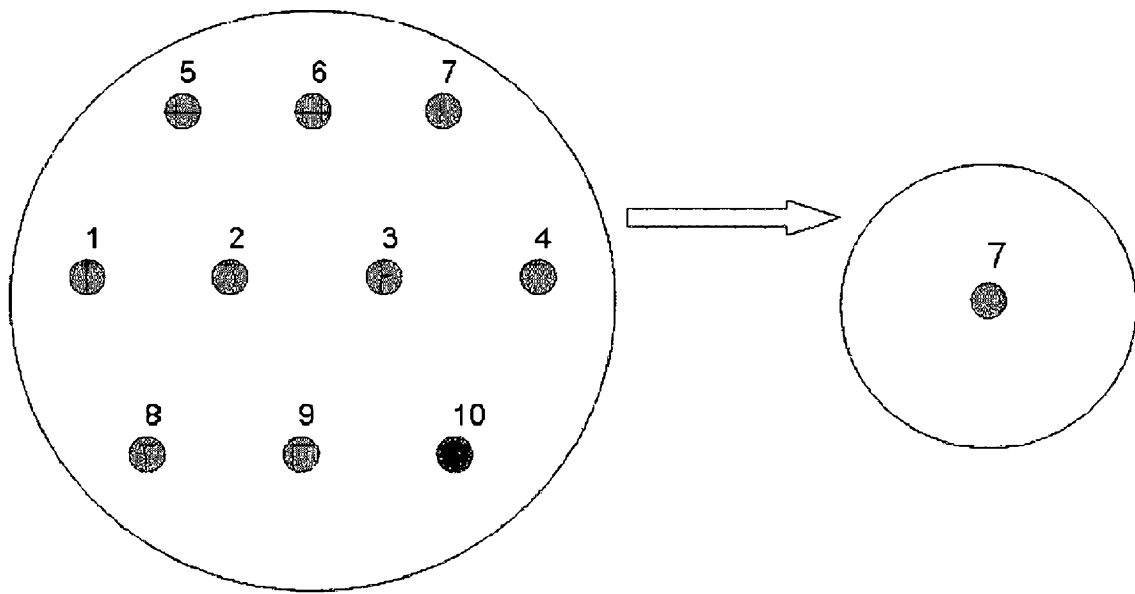


Fig. 7

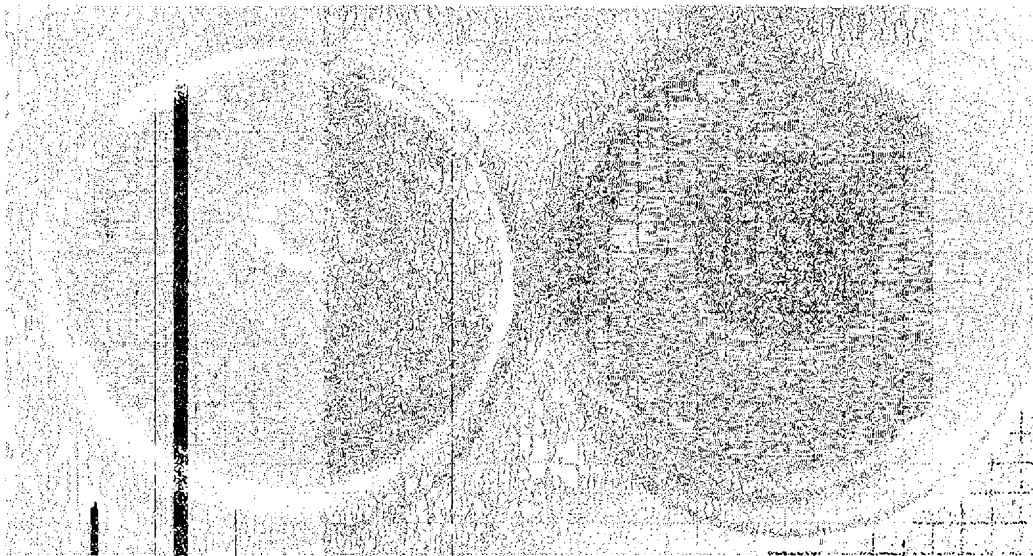


Fig. 8

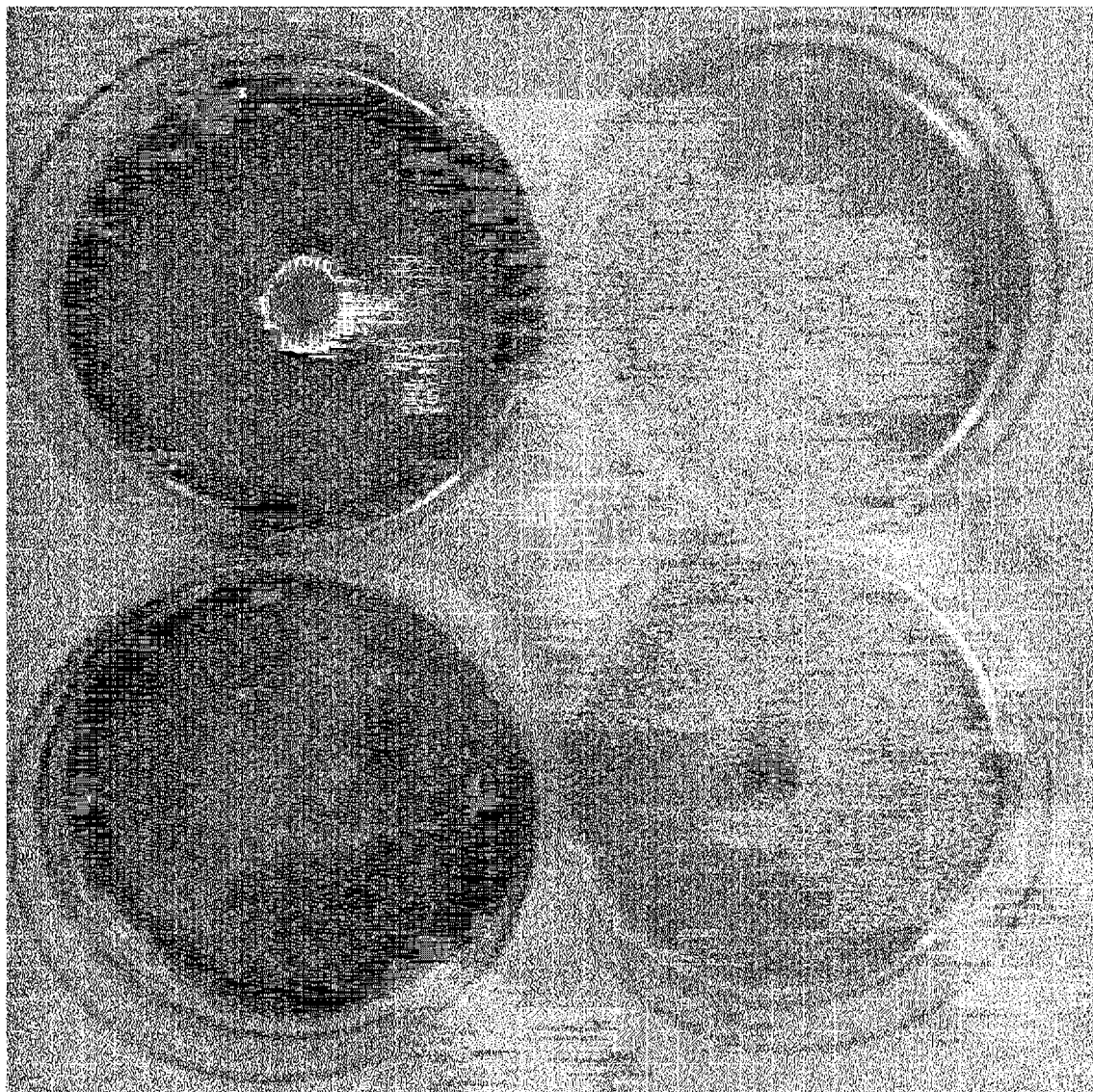


Fig. 9