

生产环境的致病菌监控



Keeping
Food Safe through
Smart Innovation

3M 技术支持：张洪沂
2016-08-04



Food Safety Training Program

© 2012 3M. All Rights Reserved.

提 纲

- 环境监控的意义
- 如何监控环境
- 区域的划分
- 如何建立生产环境中致病菌监控方案

食品污染

- 食品污染分为物理性污染（如放射性物质的污染），化学性污染（如重金属盐类的污染）和生物性污染（如由微生物、寄生虫、虫卵和昆虫等引起的污染）。
- 我们这里讲的**食品污染**主要指的是**生物污染**中由**微生物引起的污染**。即指的是食品受到外来的多种微生物的作用而引起的污染。



微生物污染源



Sampling of the production and processing environment can be a useful tool to identify and prevent the presence of pathogenic microorganisms in food.

生产和加工环境中的采样是用来确认和预防食品中出现致病性微生物的非常有用的工具。

-----欧盟标准规范2073/2005

表面菌落计数与产品的污染

“ SEM showed rods and cocci attached to handling and cleaning tools

环境表面监测表面清洁工具有杆菌与球菌

Genetically similar strains (100%) were isolated from cleaning and handling tools and associated RTE

即食食品和清洁工具上分离得到的菌株基因型相同

Transfer of pathogens from cleaning tools to food may hold food safety implications

致病菌从清洁工具转移到了食品。。。 ”

Prof Chris Griffith, UWIC 2008

“One study suggests if an organism is found in the environment there is a 70% chance of it getting into the food.”

“研究表面：在加工环境中存在的某种微生物能有70%的机会进入到食品。”

IAFP Rome 2007

“While it is not possible to prevent the introduction of pathogens into food processing facilities, it is crucial to **minimize their presence.**”

“不能阻止致病菌污染生产设备， 的目的是减少致病菌的存在”

- ICMSF（国际食品微生物标准委员会）

Source: Pathogen environmental monitoring program (PEM), Almond Board of California

环境监控的趋势

- 有效的环境监控计划可以有效的防止食品污染
- 国家的监管机构会推荐环境监控

Thanks to Prof. Martin Wiedmann, Cornell University, New York

United States Food Safety Modernization Act (2011)

美国食品现代法案

- FSMA的目标是将注意力从**应对污染**转移到**预防污染**，确保美国的食品供应是安全。



- Section 103 of FSMA is “Mandatory Preventive Control”... five of these new programs (>60%!) are related to **environmental control**.
- FSMA的第103部分是“强制预防控制...” 这个部分的五个项目 (>60%!) 都和**环境控制**相关。

What is on the Horizon?

Food Safety Modernization Act (FSMA)

Mandatory Preventive Controls Sec 103

- Environmental monitoring programs
 - Sanitation and cleaning requirements
 - Allergen control
 - Mitigation of hazards
 - Supplier verification
- 环境监控
 - 环境卫生和清洗
 - 过敏原控制
 - 减轻危害
 - 供应商验证

欧洲标准规范2073/2005

- **欧洲标准规范2073/2005 规定需要对生产商进行环境监控**
 - **即食食品，单增李斯特氏菌风险**
 - **婴儿配方食品或用于6个月以下婴儿有特殊医疗用途的食品，阪崎肠杆菌的风险**

Food Safety Authority of Ireland: http://www.fsai.ie/food_businesses/haccp/micro_criteria.html

中国

关于发布食品安全国家标准《食品生产通用卫生规范》 (GB14881-2013)的公告(2013)

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 20

2013年 第4号

根据《中华人民共和国食品安全法》
《食品安全国家标准管理办法》规定，经食品安全国家标准审评委员会审查通过，现发布食品安全国家标准《食品生产通用卫生规范》(GB14881-2013)。

特此公告。

本标准代替GB 14881-1994《食品企业通用卫生规范》。

本标准与GB 14881-1994相比

- 修改了标准名称；
- 修改了标准结构；
- 增加了术语和定义；
- 强调了对原料、加工、贮存、运输、销售、使用等环节中生物、化学、物理污染物的控制；
- 修改了生产设备有关内容，增加了清洗消毒要求；
- 增加了原料采购、验收、贮存、运输、销售、使用等环节的要求；
- 增加了产品追溯与召回的要求；
- 增加了记录和文件的管理要求；
- 增加了附录A“食品加工过程微生物监控”。

表A.1 食品加工过程微生物监控示例

监控项目	建议取样点 ^a	建议监控微生物 ^b	建议监控频率 ^c	建议监控指标限值
环境的微生物监控	食品接触表面	食品加工人员的手部、工作服、手套传送皮带、工器具及其他直接接触食品的设备表面	验证清洁效果应在清洁消毒之后，其他可每周、每两周或每月	结合生产实际情况确定监控指标限值
	与食品或食品接触表面邻近的接触表面	设备外表面、支架表面、控制面板、零件车等接触表面	每两周或每月	结合生产实际情况确定监控指标限值
	加工区域内的环境空气	靠近裸露产品的位置	菌落总数、大肠菌群等卫生状况指示微生物，必要时监控致病菌	结合生产实际情况确定监控指标限值
过程产品的微生物监控	加工环节中微生物水平可能发生变化且会影响食品安全性和(或)食品品质的过程产品	菌落总数、酵母霉菌等	开班第一时间生产的产品及之后连续生产过程中每周(或每两周或每月)	结合生产实际情况确定监控指标限值

^a可根据食品特性以及加工过程实际情况选择取样点。
^b可根据需要选择一个或多个卫生指示微生物实施监控。
^c可根据具体取样点的风险确定监控频率。

为何要进行环境微生物监测？

- 仅依靠终产品检验是远远不够的！

抽检的样品数量	漏检的概率			
	% 批中污染的比例			
	10%	2%	1%	0.5%
3	73%	94%	97%	99%
10	35%	82%	90%	95%
60	<0.5%	30%	55%	74%
120	<0.5%	8.5%	30%	55%
180	<0.5%	2.6%	16%	41%
240	<0.5%	0.8%	9%	30%

Sampling and the Probability of Detection

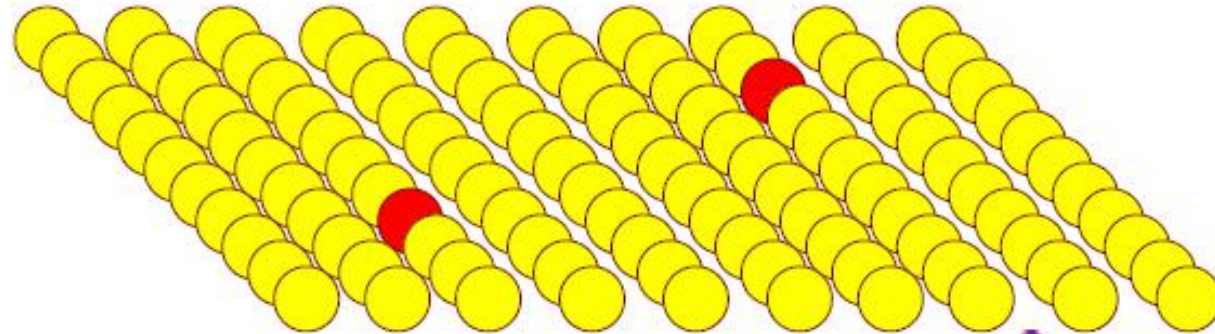
<50% defective?



<10% defective?



<1 % defective?



为何要进行环境微生物监测？

比终产品检测更实用和可靠

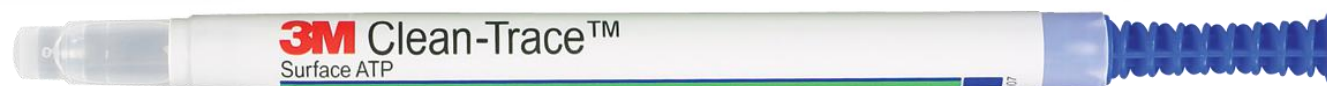
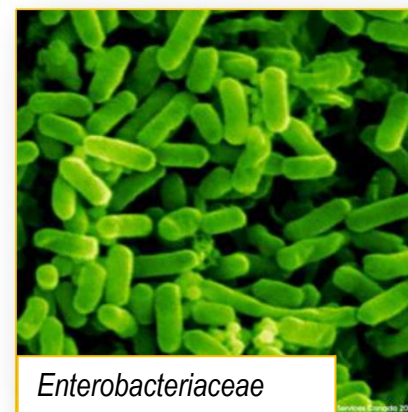
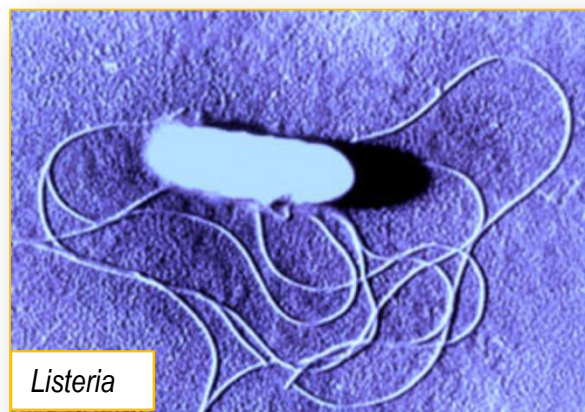
具有如下多个优点：

- 提供生产线和卫生区域的**动态信息**
- 可用于确认菌的**滋生点**
- 可用于**趋势分析**和**隔离措施有效性的验证**
- 灵活— 可根据特定情况制定**特定的采样计划**

一个有效的环境致病菌监测方案能检验“致病菌控制方程式”中的各环节是否做好。

环境监控的项目

- 指示菌 (如: 肠杆菌科, 大肠菌群, 菌落总数, 霉菌酵母)
- 致病菌 (如: 李斯特, 沙门)
- 快速卫生监控 (如: ATP, Protein)



环境监控的意义

- 指示菌 (如: 肠杆菌科, 大肠菌群, 菌落总数, 霉菌酵母)
- 致病菌 (如: 李斯特, 沙门)
- 快速卫生监控 (如: ATP, Protein)



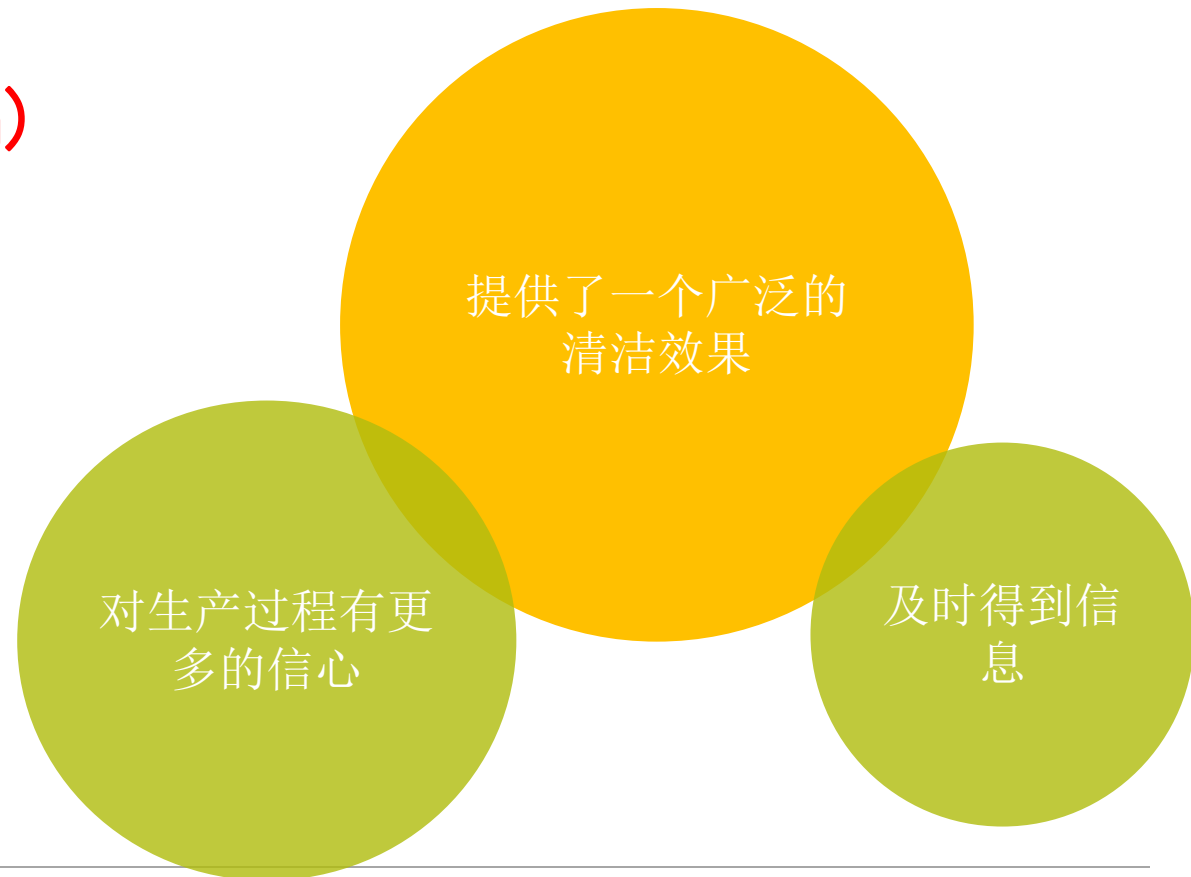
不要等到发现致病菌,
防止问题发生

大致的卫生指示

趋势可以提供
早期预警

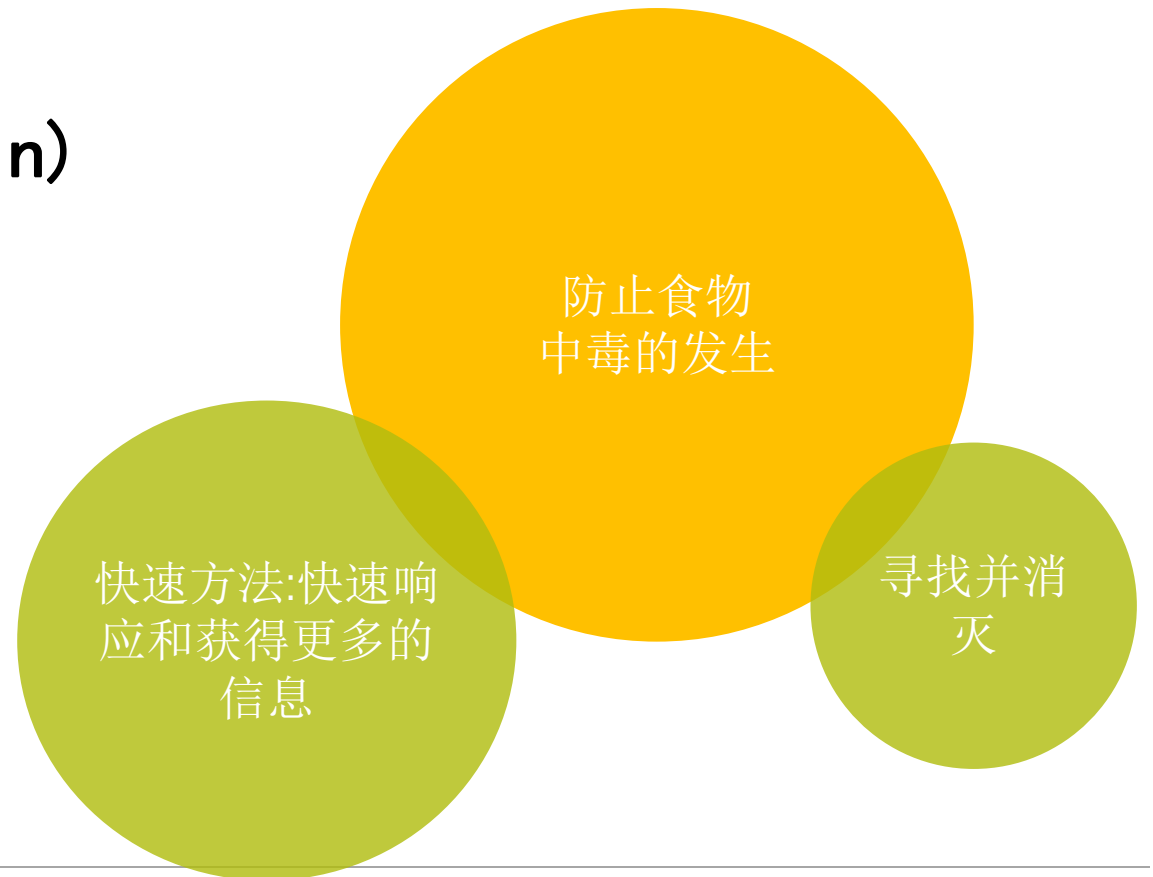
环境监控的意义

- 指示菌(如：肠杆菌科，大肠菌群，菌落总数，霉菌酵母)
- 致病菌(如：李斯特，沙门)
- **快速卫生监控 (如： ATP, Protein)**



环境监控的意义

- 指示菌(如: 肠杆菌科, 大肠菌群, 菌落总数, 霉菌酵母)
- 致病菌(如: 李斯特, 沙门)
- 快速卫生监控(如: ATP, Protein)



致病菌的几个特点

致病菌分布的广泛性

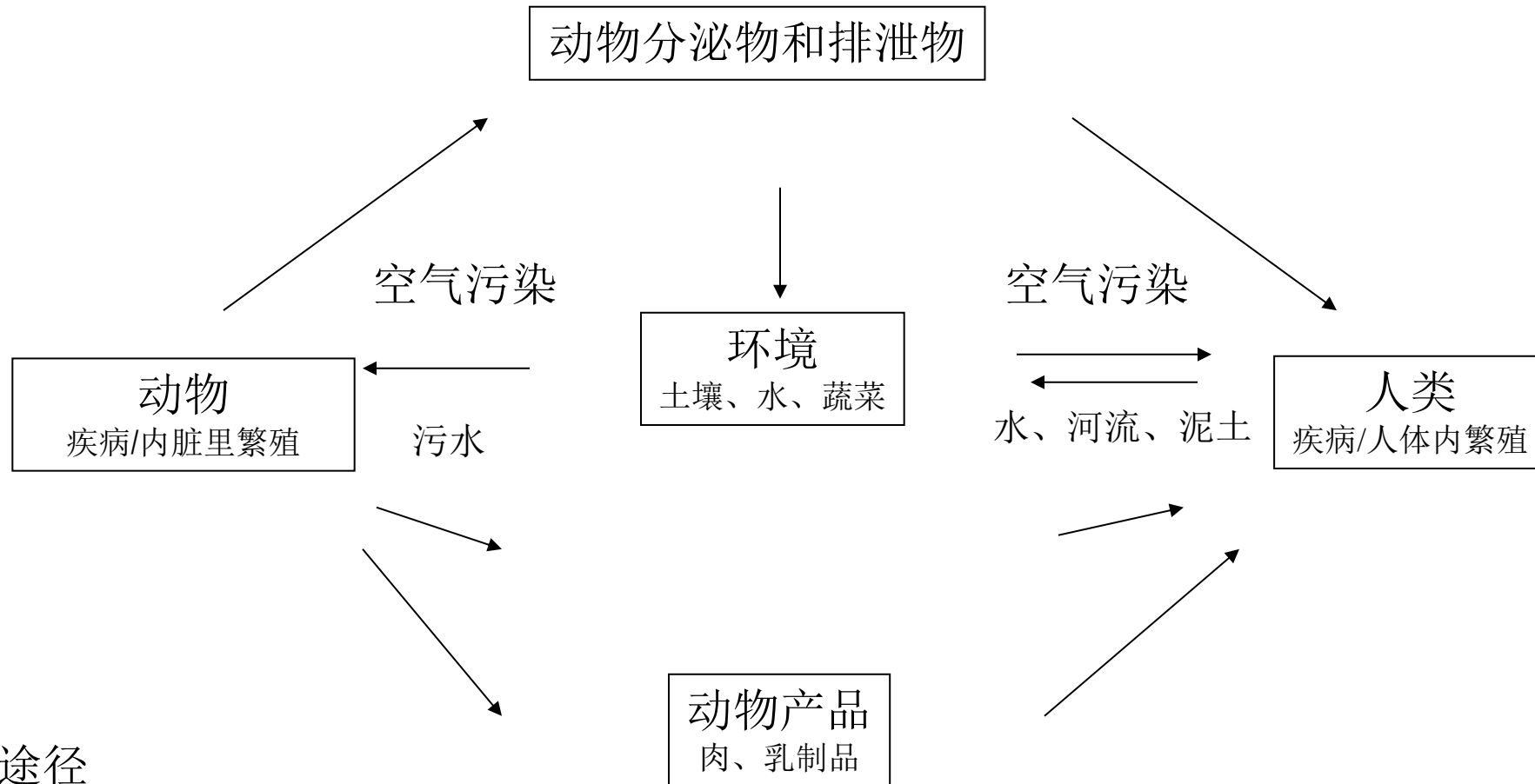









Fig. 单增传播途径
From Audurier and Martin.

致病菌的长期寄居性

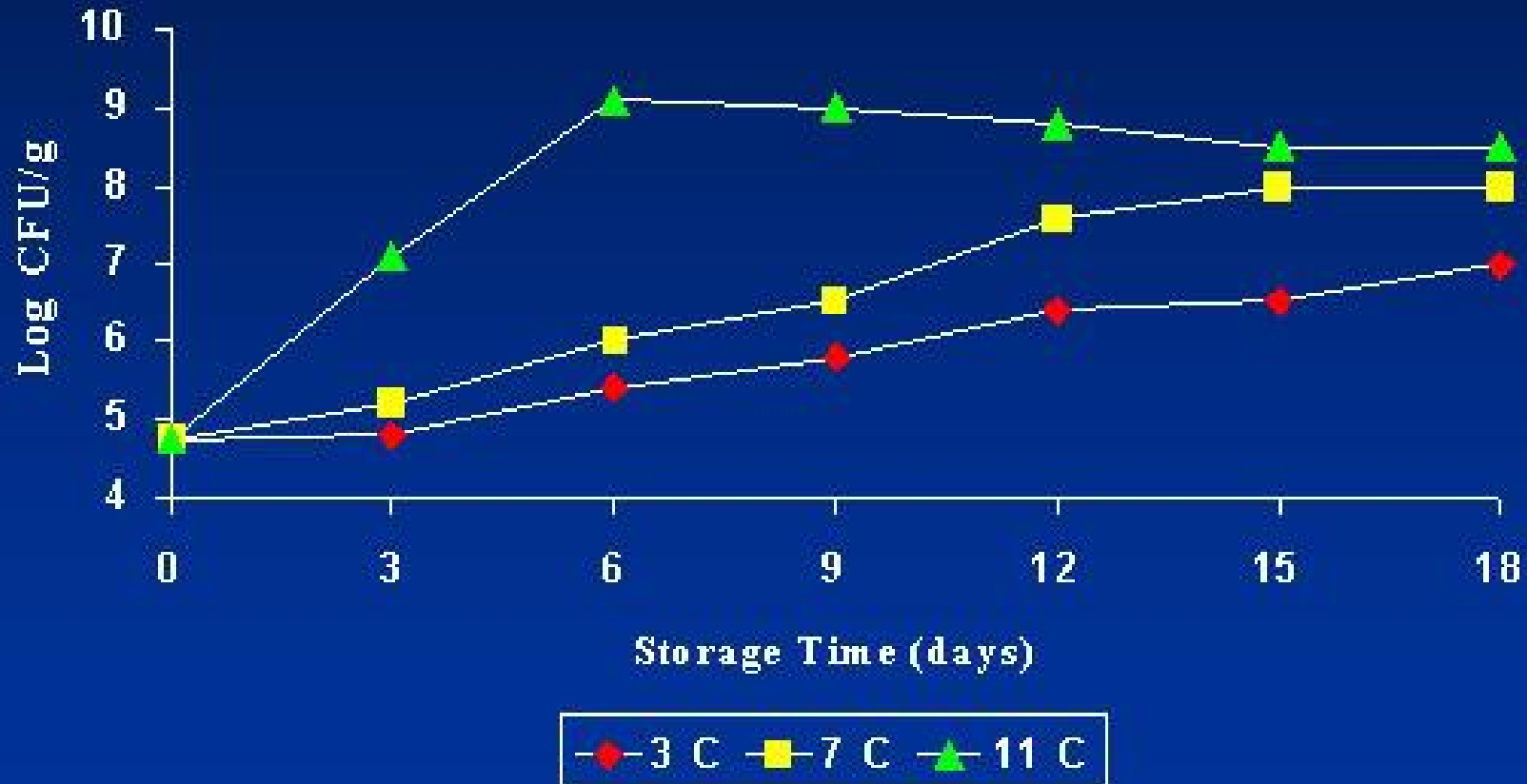
2000年美国爆发案例--环境中存在单增吗？

- 1988：某工厂X生产的热狗导致一人得李斯特菌病
- 2000：同工厂X生产的切片火鸡产品导致29人得李斯特菌病

DuPont ID/ DuPont ID Label	RiboPrint(R) Pattern
DUP-1052 Listeria monocytogenes	
DUP-1052 Listeria monocytogenes	
DUP-1052 Listeria monocytogenes	
DUP-1052 Listeria monocytogenes	
DUP-1052 Listeria monocytogenes	
DUP-1052 Listeria monocytogenes	
DUP-1052 Listeria monocytogenes	

Growth of *L. monocytogenes* on RTE chicken nuggets

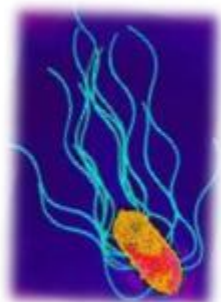
单核增生李斯特菌在即食鸡块中的生长



致病菌检测项目的选择？



• *Salmonella*

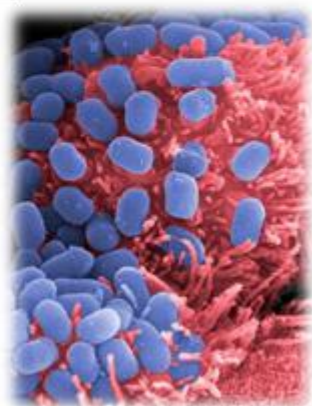


- 在你的终产品中，什么是主要的致病菌？
- 此致病菌的鉴定是基于科学证据/或历史数据，如冷饮中的李斯特菌。

• *Listeria*



• *E.coli* O157



食品类别	致病菌指标	采样方案及限量 (若非指定, 均以/25 g或/25 mL表示)			
		n	c	m	M
粮食制品 熟制粮食制品 (含焙烤类) 熟制带馅 (料) 面食制品 方便米面制品	沙门氏菌	5	0	0	-
	金黄色葡萄球菌	5	1	100 CFU/g	1000 CFU/g

在哪里检测 - 区域的概念

- 车间应分成不同的区域
- 原则：根据某个位点或区域可能对成品造成污染的相对程度来划分；
- 若检出阳性样本，需要采样和实施纠正措施，且根据区域不同而有所不同。

Zone 1: 终产品的直接接触面

Zone 2: 在终产品区域的非食品接触面

Zone 3: 原料加工区的产品接触表面

Zone 4: 远离成品加工区的表面(如原料加工区的非食品接触表面)

Thanks to Prof. Martin Wiedmann, Cornell University, New York

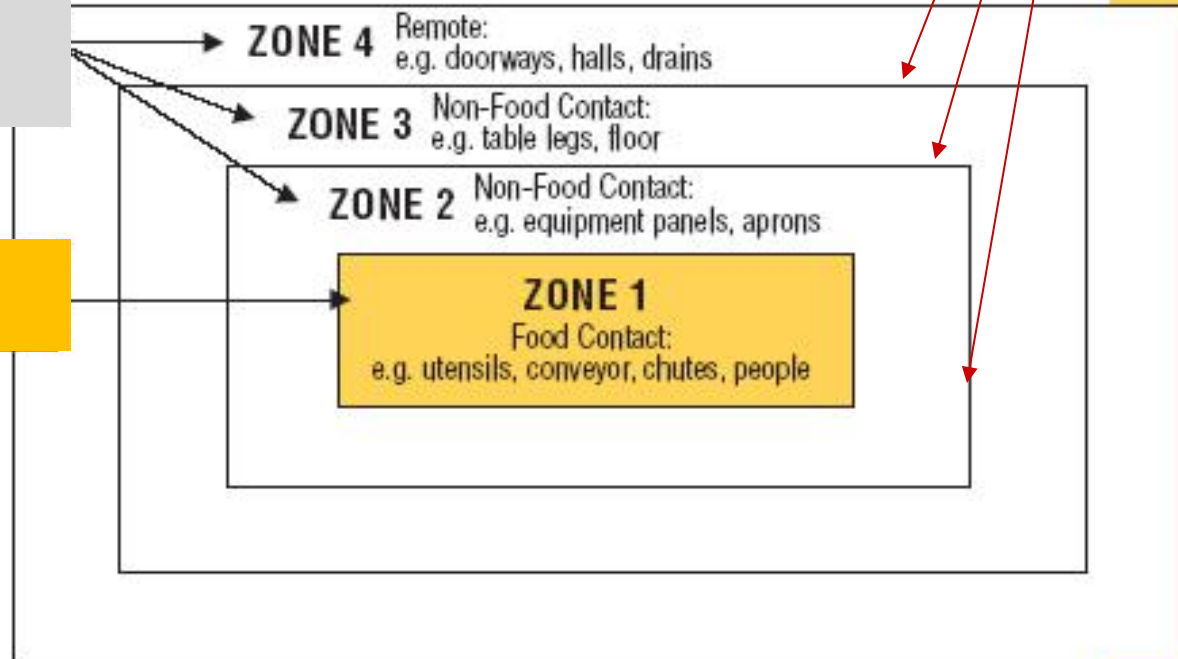
Zero in on the source of *Listeria*.

Because *Listeria* is an organism that occurs naturally in the environment, there are plenty of opportunities to continually reintroduce it into the processing plant. One effective way to control *Listeria* is by monitoring the levels of environmental contamination in different parts of the plant.

进行更多的环境检测

防止这里的食品污染

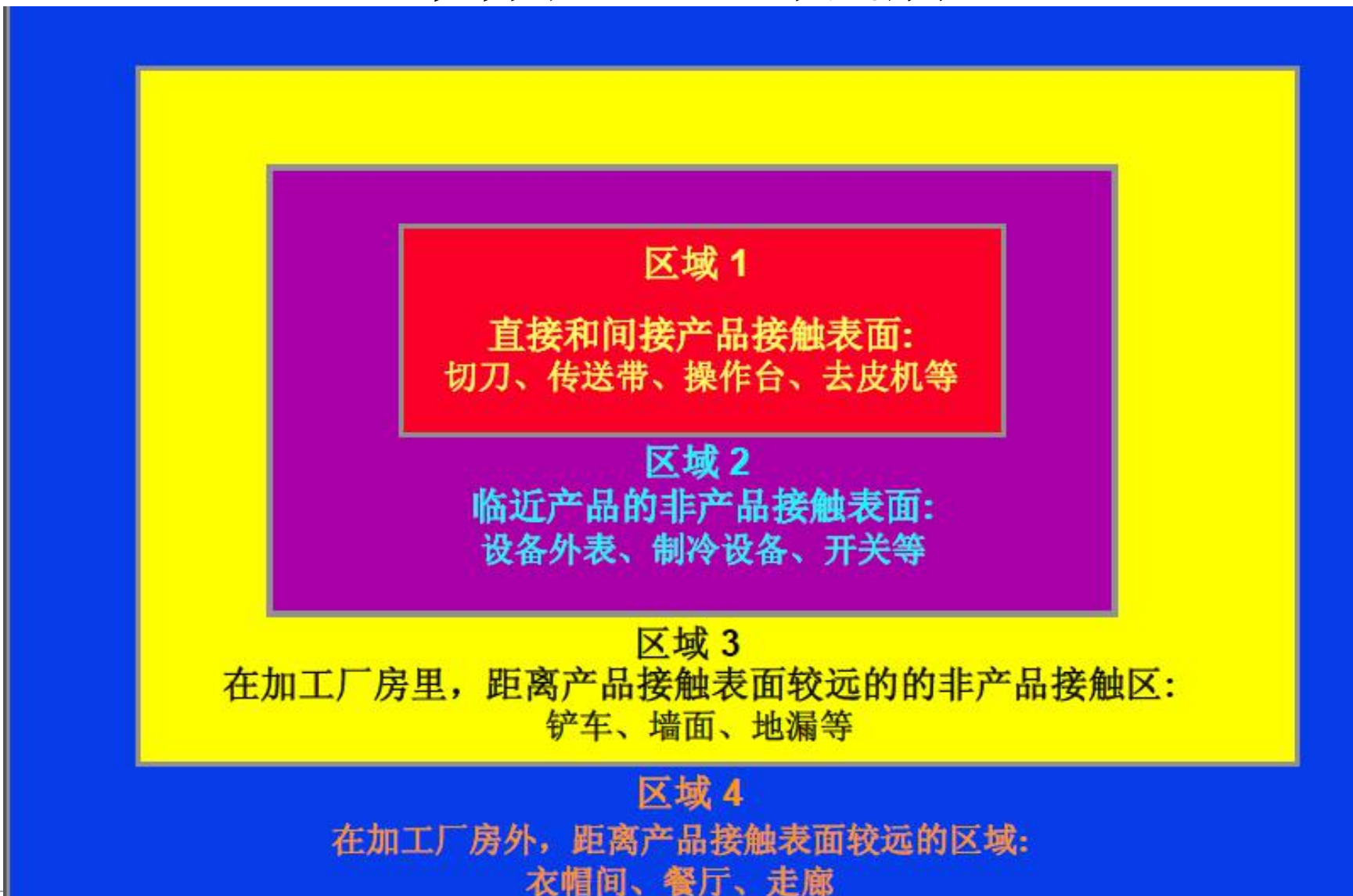
By identifying and eliminating *Listeria* away from your production you can minimize your risks.



采样位点-区域划分



采样位点-区域划分



区域 1 - 烘烤后至产品包装前的工序中的食品直接面

- ✓ 传送带/铲斗
- ✓ 器具
- ✓ 员工手(如果接触食品)
- ✓ 切片机
- ✓ 漏斗
- ✓ 卸物槽
- ✓ 填充器



区域 2 - 临近产品接触面的非食品接触面

- ✓ 设备框架
- ✓ 滴水罩/屋顶
- ✓ 控制面板/按钮
- ✓ 越过区域1表面的管道
- ✓ 电脑屏幕
- ✓ 维修工具



区域 3 - 热致死工序后敞开加工区的非食品接触表面，但并不靠近区域1的表面

— 区域 3 的表面可能会导致产品的再污染

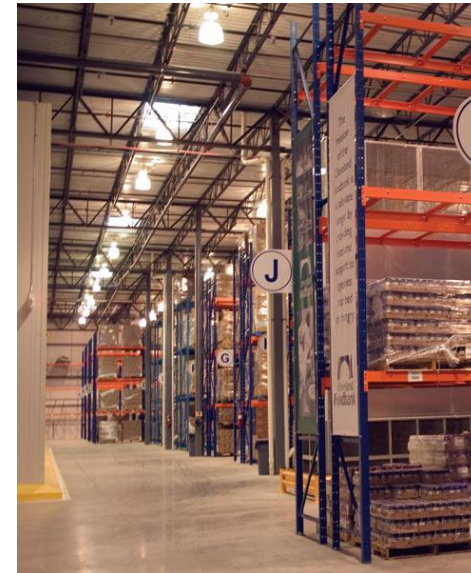
- ＞ 地面，墙面，天花板
- ＞ 软管
- ＞ 地漏
- ＞ 冷凝水盘
- ＞ 手推车，铲车，
- ＞ 垃圾桶
- ＞ 货盘
- ＞ 鞋池或脚垫
- ＞ 拖布
- ＞ 工具箱



区域4 - 远离致死处理后区域的地方

— 区域4如果不保持良好卫生条件会交叉污染到区域 1 - 3 。

- ✓走廊
- ✓装货处
- ✓卫生间
- ✓衣帽间
- ✓员工餐厅/休息室
- ✓冰箱
- ✓维修车间
- ✓办公区



致病菌环境监测的实施方法

— 沙门氏菌为例

低水分活度食品中易引起沙门污染的原料

- 巧克力、巧克力浆、可可粉、巧克力饼、可可制品
- 坚果及制品
- 椰果
- 种子及制品
- 谷物及制品（不包括面粉）
- 干制蛋制品
- 水果及制品（不包括蜜制或含酒精水果、果酱或果胶）
- 乳品成分及混合物
- 香料/药草（不包括提取物），混合调味品
- 豆制品
- 胶质、增稠剂（不包括黄原胶）
- 酵母/酵母提取物
- 明胶
- 脱水蔬菜
- 酶/凝乳酶
- 干制肉制品及副产品

1

决定监控是否需要(基于生产的是否是微生物敏感产品)

2

- 文件化要求和指导书
- 确定监控的目标菌
- 适用的产品或加工过程
- 取样点, 频率和取样方法
- 测试方法和可接受的标准
- 纠偏行动计划
- 培训

3

决定样品在哪里测试

4

测试方法是否正确

5

建立相应的纠偏措施, 保留记录

环境致病菌监控方案

环境致病菌监控程序

适用于**生产微生物敏感产品**的工厂

什么是微生物敏感产品

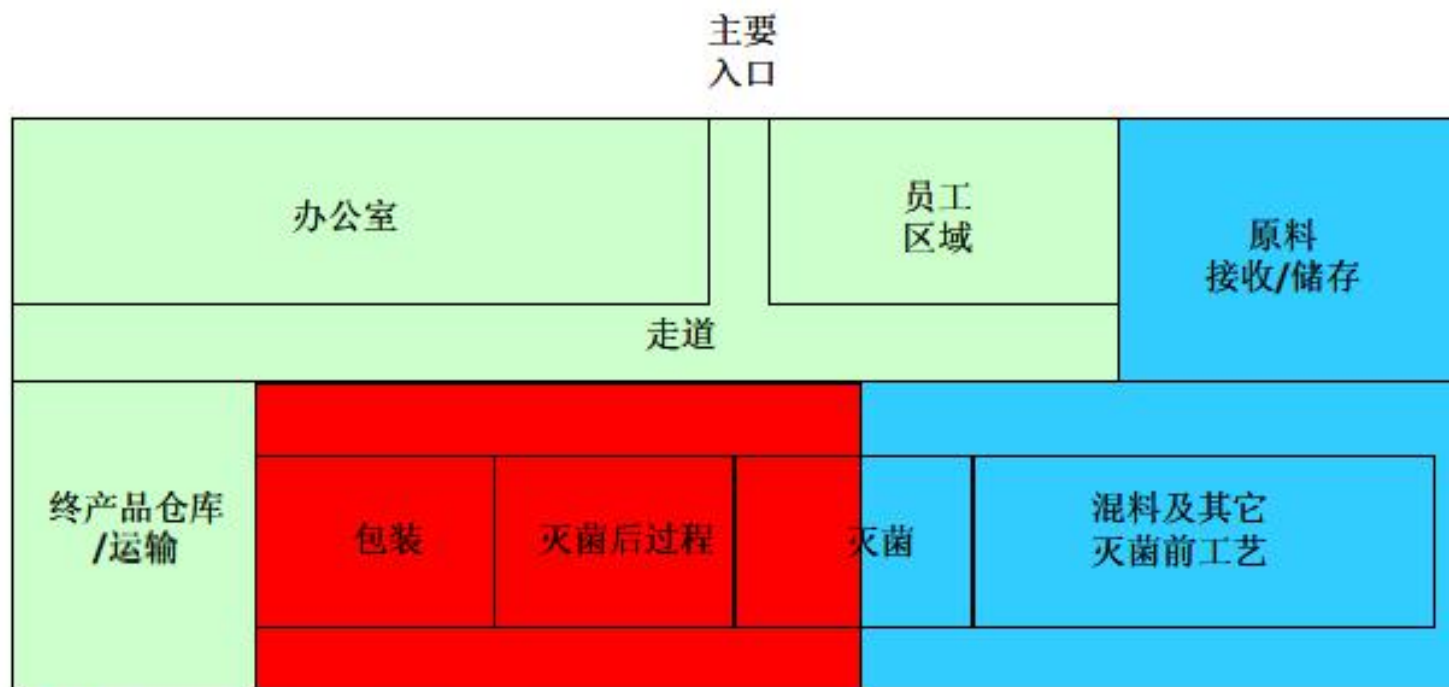
- 任何成品，加工后包装前能被再污染的产品；并且能支持致病菌生长或存活的产品。
- 此致病菌的鉴定是基于科学证据/或历史数据，如巧克力中的沙门氏菌，奶酪和肉里的李斯特菌。

一般情况，致病菌环境监控关注于检测两种特殊的致病菌：

- 沙门氏菌
- 单增李斯特菌

区域划分及采样点

依据不同卫生区域的工厂布局



- PSCA (沙门氏菌主要控制区域)
- 基本GMP区域
- 非生产区域

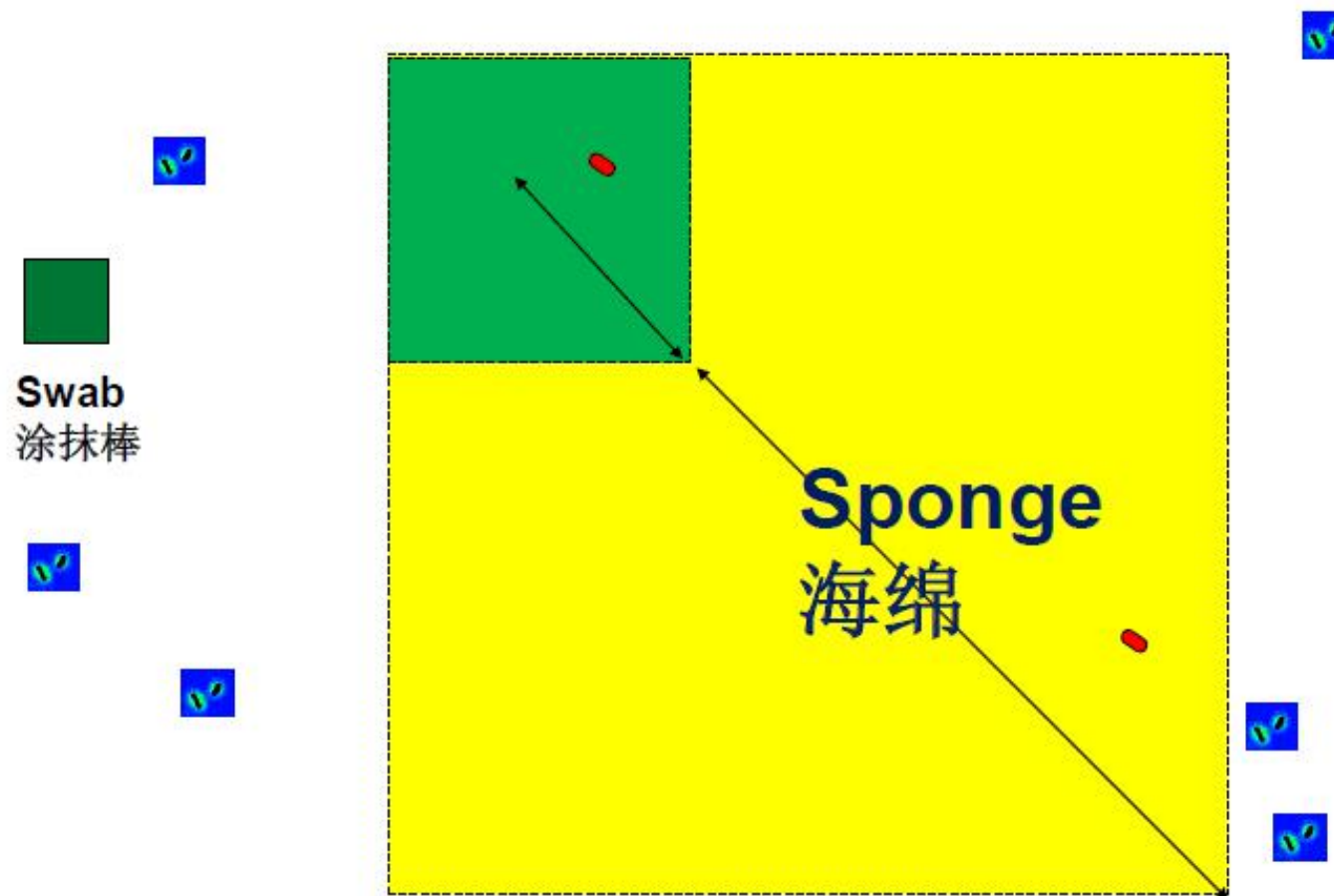
重点关注：灭菌之后到包装之前的生产过程

区域的划分

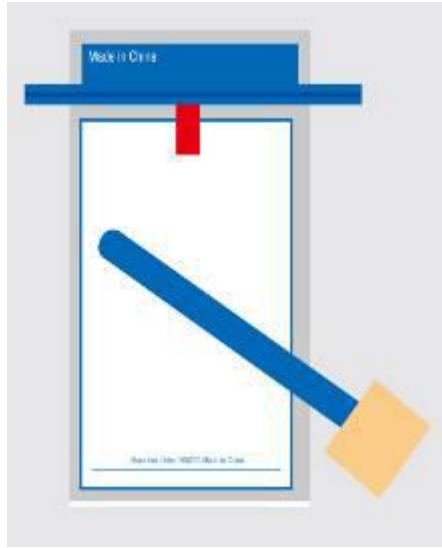
- 区域2: **临近产品的非产品接触表面**。是指在正常运行程序中, 不接触产品或是产品接触容器的所有表面, 包括设备外表、制冷设备、框架、设备护盖(仪表板的按钮、操作按钮)、围裙、拖布把手、手套、称重控制数据输入等等。
- 区域3: **在距离产品接触表面较远的加工厂房里的非产品**。比如手推车、有轮的设备、叉车、墙、地沟、地板等等。
- 区域4: **在加工厂房外距离产品接触表面较远的区域**。比如廊、浴室的门、自助餐厅、冷却器等等。

采样工具

为什么要用海绵采样？



3M™海绵涂抹类产品（致病菌）



- 坚固的金属丝
- 蓝色无菌手套和开封条，更易识别
- 红色垂条，方便开袋且防止污染
- 纤维素质海绵，用于畜体和表面采样
- 预置中和缓冲液（Neutralizing Buffer）
- 双层聚乙烯碾压无菌袋，双倍强度
- 伽马辐照灭菌，无灭菌剂残留

对于环境采样，美国官方使用sponge作为采样工具

参考文献：USDA Title : Isolation And Identification of Salmonella From Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental sponges. Effective Date:06/29/14

Beef Mixed Products	25 ± 2.5 g	75 ± 1.5 ml mTSB	
Poultry Carcass and Environmental Sponges	1 sponge pre-moistened with 10 ml buffer	50 ± 1 ml BPW to bring total volume to 60 ml*	35 ± 2°C for 20-24 h
Meat Carcass and Environmental Sponges	1 sponge pre-moistened with 10 ml buffer	50 ± 1 ml mTSB to bring total volume to 60 ml*	42 ± 1°C for 15-24 h

4.5.4 Carcass Sponges and Environmental Sponges

- For poultry carcass or environmental sponges, add the BPW to the sample bag containing a sponge moistened with 10 ml of buffer to bring the total volume to 60 ml. Mix well. If the project calls for a larger volume of buffer, adjust the volume of enrichment broth to a 1:6 ratio. Incubate at 35 ± 2°C for 20-24 h.
- For meat carcass or environmental sponges, add the mTSB to the sample bag containing a sponge moistened with 10 ml of buffer to bring the total volume to

3M 海绵采样棒的不同中和液

The table below summarizes the neutralization capability of each selected buffer or broth. (√) indicates neutralizing activity.

Sanitizing Agent	Letheen 肉汤	D/E 肉汤	Neutralizing Buffer (NB缓冲液)
季铵盐	√	√	√
酚化合物	√	√	
碘、氯化物	√	√	√
汞制剂		√	
甲醛		√	
戊二醛		√	

工厂使用消毒剂，会影响对目标菌的采集

Neutralizing Buffer; pH 7.2 +/- 0.3 @25 Degrees C	
成份	主要作用
芳基络合化合物 5.0g	中和季铵盐和含氯消毒剂
硫代硫酸钠 160.0mg	中和季铵盐和含氯消毒剂
磷酸钾盐 42.5mg	稳定pH环境
氢氧化钠 8.0mg	调节pH

采样频率与程序

致病菌环境监控采样和检测方法

有两种检测方法：

- 检测特定目标致病菌（沙门）
- 检测潜在致病菌的指示菌

可用的指标菌：

- 大肠菌群/大肠杆菌
- 肠杆菌科是更好的环境指示（干燥）
- 李斯特菌属

菌落总数主要是作为加工环境的质量指示

- 不能作为致病菌的安全指示，两者无关联

致病菌环境监控采样和检测方法

- 环境中沙门氏菌的检测常发生在区域2, 3和4
- 区域1主要检测指示菌, 如肠杆菌科
 - 只有在特殊情况下才会在区域1检测沙门, 比如发生了可能带来潜在污染的特殊事件: 成品检测出了沙门、天花板漏水等— 需要深度调查。
 - 区域1检测沙门时, 需要严格对产品实行扣留, 直到检测结果表明没有问题时才能放行。



致病菌环境监控采样的频率

- 环境采样的位点与数量取决于该产品与工艺的风险水平
 - 检测频率比较高的位点包括：使用水的区域、人流物流繁忙的区域、曾经检出过致病菌的区域、处理与储存易受到微生物污染的原料的区域。
 - 应关注**灭菌后的产品区域**，该区域的产品再污染的风险较高
 - 应根据具体某天或某生产批次进行位点的轮换

区域2、**区域3**每周监测一次，**区域4**每月监测一次。



采样程序

- 采样操作人员应是经过了适当的培训、有资质的人员
 - 采样面积越大越好，至少达到900 cm²
 - 若存在消毒剂，则需考虑中和缓冲液(e.g. D/E 中和缓冲液)
-
- 区域1中若采样工具已预润湿，则采样完后需用含酒精的消毒剂处理
 - 每批环境采样需包含阴性对照
 - 将海绵或采样棒用无菌手套取出后再放回到采样袋或容器中
 - 应作标记，方便区分

采样数量

致病菌环境监控样品的数量

- 总的PEM每周采样数量取决于工厂大小和历史数据情况
- 应灵活，具有可调节性，根据QA工作小组的决策实时增加额外的采样
- 区域1的采样取决于生产线的类型及采样目的（比如问题调查、验证与确认等）
- 一般，区域2、3的采样数量多于区域4
 - 通常区域2、3为10 - 15个样品/周；而区域4为5-10个样品/月，并取决于区域的面积

采样时间

何时检测？

- 操作前
 - 不太可能有阳性样品
 - 易于解释，利于确定卫生薄弱点
- 操作中
 - 可能有阳性检出
 - 可以提供目标病原体在加工过程中的传播信息
 - 阳性检出点不一定是病原体生长位置

- 区域1的采样必须独立，不能混样
- 在区域2和3在生产中采样
 - 生产中的采样应贯穿整个生产周期（如生产刚开始时、3 - 4小时后，生产结束前）
 - 采样时间点和位点每周轮换
- 区域4以月为单位采样，重点在接近PSCA的区域



致病菌环境监控采样的总结

区域	采样位点	微生物检测	最小检测频率	通常采样数
I	直接或间接食品接触面	沙门控制的指标菌 (肠杆菌科)	每周, 清洗后, 生产前, 或调查, 验证	依生产线或目的而定
II	临近食品接触面的环境样品	沙门	每周	10 - 15

注：以干燥制品控制沙门氏菌为例

致病菌环境监控采样的总结

区域	采样位点	微生物检测	最小检测频率	通常样品数
III	离开食品加工区的环境表面	沙门	每周	10 - 15
IV	远离加工区的其他地方	沙门	每周	5 - 10

数据的解读和纠偏措施

- 在执行常规采样计划前，工厂应当提前制定好纠偏方案
 - 4个区域都有各自不同的纠偏方案，包括：
 - 各区域及时纠偏措施的类型
 - 确认沙门氏菌已在区域内被消除的行动起来措施
 - 污染根源分析，以防止将来的污染
 - 一般来说，出现推测性阳性结果时，推荐按阳性结果的程序处理
 - 这是最保守的方法。万一是阳性，可节省时间！

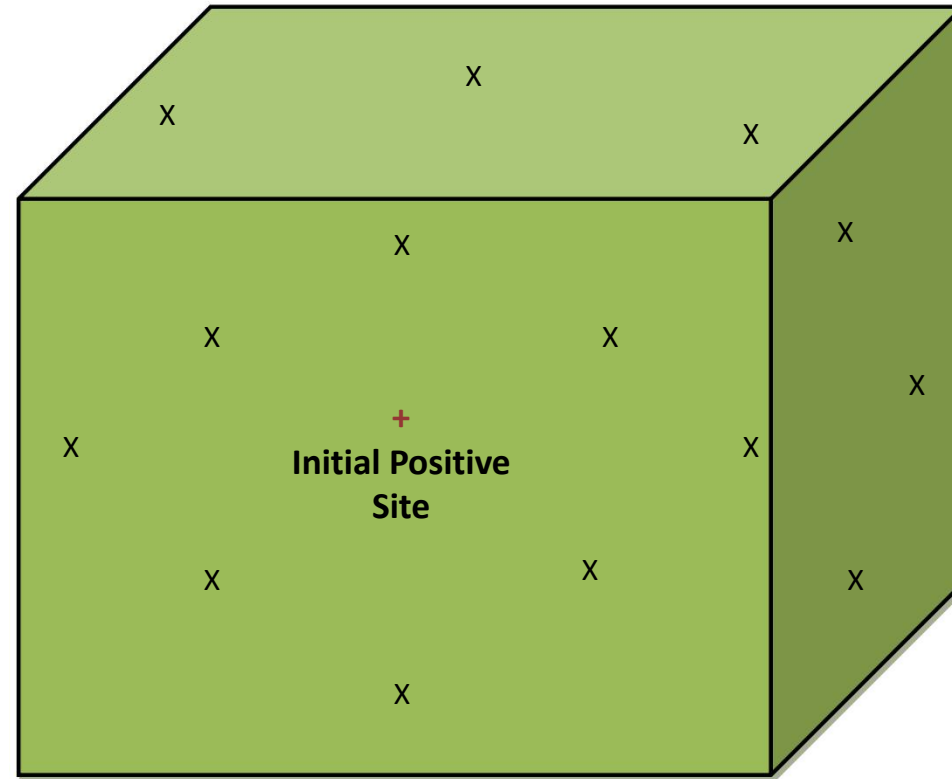


数据的解读和纠偏措施

- 所有纠偏行动及额外的采样结果都应适当记录下来
 - 电子数据表或数据库用于追踪结果和记录
- 在任何区域检出有阳性结果，则应在该区域全面检查：肉眼方式或矢量采样方法
 - 矢量采样方法需要在阳性位点周围采集更多样品
 - 一般来说，10-15个样品，各个方向（发散状）
 - 问题调查的样品应单独检测，不能混样

Vector Swabbing Schematic

矢量法涂抹采样的示意图



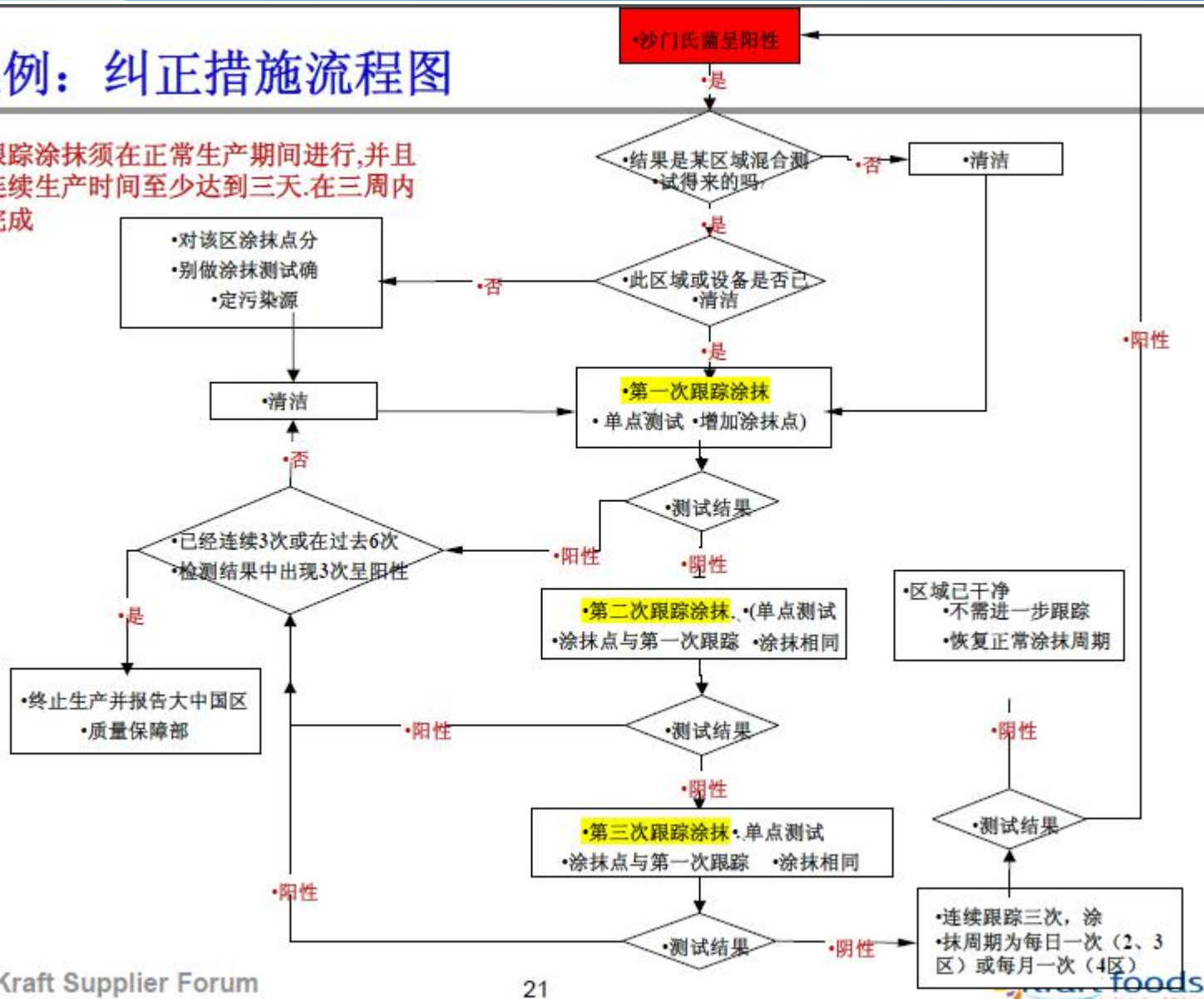
数据的解读和纠偏措施

- 重新检查**人流物流**方式，可行的话要进行改造
 - 检查**操作程序**（产品、卫生、维护和原料操作）
 - 根据需要，重新设计和/或进行**设备维护**
 - 开展擦洗地面或清洗顶部管道设备的**清洁工作**
- 区域4中偶尔会发现沙门阳性情况并不少见
 - 区域3阳性，区域2未发现阳性 — 表明清洗和卫生程序需要加强



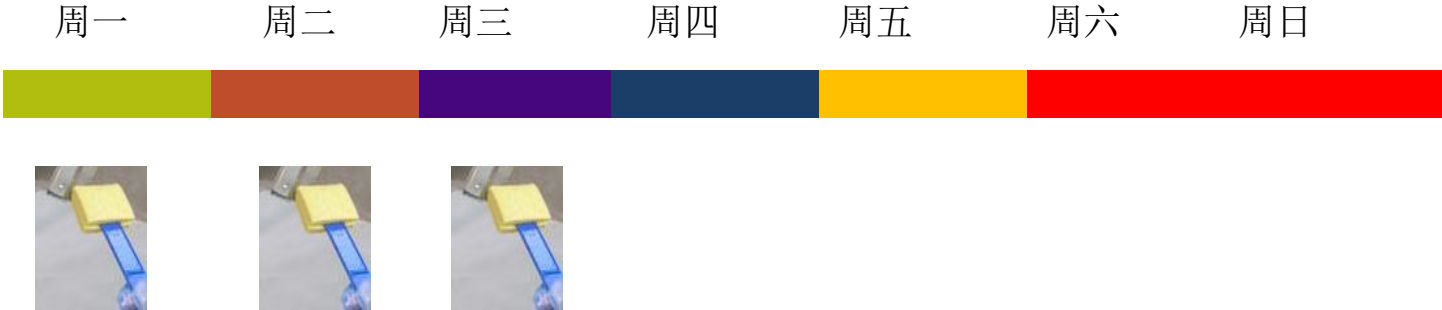
案例：纠正措施流程图

跟踪涂抹须在正常生产期间进行,并且连续生产时间至少达到三天.在三周内完成



环境监控对致病菌检测时间的要求

原则：任一阳性结果必须采取立即对纠正措施！！



传统检测方法(5天)



快速(1天)



ATP检测(实时)



3M™24小时解决方案

No	微生物项目	3M解决方案	出结果时间(小时)
1	菌落总数	RAC	24
2	金黄色葡萄球菌	STX	24
3	大肠菌群	PCC/HSCC/RCC	24 / 6-14
4	大肠杆菌	PEC	24
5	粪大肠菌群	PCC/HSCC/RCC	24
6	肠杆菌科	PEB	24
7	乳酸菌*	PAC+MRS	48
8	霉菌酵母*	RYM	48
9	沙门氏菌	MDS	24
10	李斯特菌属	MDS, PEL (环境)	24
11	单增李斯特菌	MDS	24
12	大肠杆菌0157	MDS	24
13	弯曲杆菌	Tecra Visual Immuno Assay	24

问 题？

3M Food Safety products are at work in more than 60 countries around the globe, to help keep businesses like yours moving forward. Our passion is to work with you to discover new food safety solutions that protect your brand, mitigate your risk and improve your operations. And every day, our people are there to support you locally, by providing technical help and exceptional service.

谢谢大家！