

# Luminometrie Kontrola potravin

# Profil společnosti

**Feed Additives**

**Animal Health**

**Agro-Food  
Diagnostics**

**Veterinary  
Diagnostics**

**Analytical  
Instruments**



**Agro-Food Diagnostics**

AUSTRIA BULGARIA CROATIA CZECH REPUBLIC HUNGARY POLAND ROMANIA SERBIA SLOVAKIA SLOVENIA

# Oddělení diagnostik

- **Mikrobiologie** – otisky, kultivační půdy, vybavení laboratoře, odběr a příprava vzorků (homogenizační sáčky, stěry), Petrifilmy
- **ATP Soupravy** – kontrola prostředí nebo hotových výrobků
- **Elisa soupravy** – alergeny, mykotoxiny, patogeny, RIL
- **PCR** – patogeny, falšování potravin
- **Enzymatické metody**
- **Analytické přístroje** – NIR, FT-IR,
- **Veterinární diagnostika**

# Zastupované společnosti v ČR (mikrobiologie)

- Orion diagnostika
- Biokar diagnostics
- Neogen
- 3M
- Interscience
- Dr. Möller & Schmelz
- Applied Biosystems

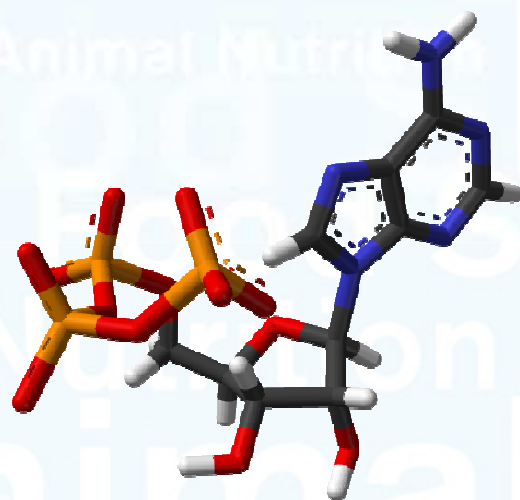


# Osnova přednášky

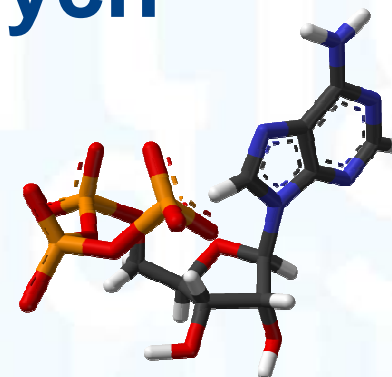
- Princip luminometrie
- ATP systémy pro kontrolu čistoty prostředí
- ATP systémy pro kontrolu sterility UHT výrobků
- MDS – Molecular Detection System (patogeny)



# 1. Princip luminometrie



# Význam a množství ATP v živých soustavách



- ATP = přenašeč energie v živých buňkách
- Jako zdroj energie pro enzymové procesy je univerzálním prostředkem energetické výměny buněk.
- Obsah ATP v intracelulárním prostředí v mM/l, extracelulárně v nM/l max. v  $\mu$ M/l.

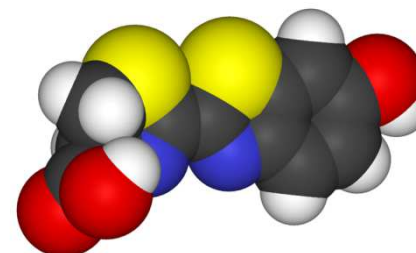
# Měření obsahu ATP k indikaci kontaminace



- Základní chemickou metodou je spektrofotometrie.
- Metoda bioluminiscence vykazuje 1000 x větší citlivost.
- Enzym luciferáza (ve světélkujících organismech, používaný v imunochémii k označení protilátek) – uvolní světlo oxidací substrátu luciferinu s využitím energie ATP (+Mg).



## Princip reakce



**LUCIFERIN**

- Chemická reakce katalyzovaná luciferázou probíhá ve dvou krocích :
  1. Luciferin + ATP  $\rightarrow$  luciferyladenylát +  $P_p_i$
  2. luciferyladenylát + O<sub>2</sub>  $\rightarrow$  oxyluciferin+ AMP+ světlo
- Světlo je měřeno v jednotkách **RLU** (Relative Light Units)

# Vztah obsahu ATP k naměřeným RLU



**silnější světelný signál (RLU)**



**zvýšená hladina ATP**

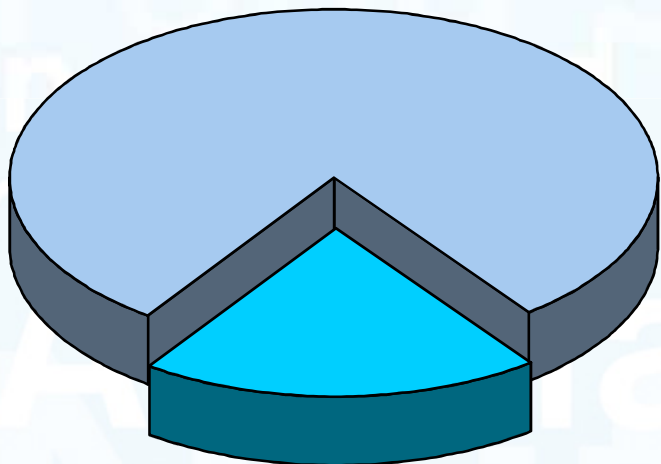


**zvýšený výskyt biologických zbytků nebo  
mikroorganismů**

Jednoduchý vztah

# Korelace RLU s celkovým organickým znečištěním

produktová ATP



mikrobiální ATP

Za přítomnosti zbytků produktů na kontaminovaných plochách nesledujeme korelaci s CFU nýbrž s „celkovou úrovní sanitace ploch“

# 3M Food Safety Solution Portfolio

## Quality Indicator Testing



3M™ Petrifilm™ Plates

## Hygiene Monitoring



3M™ Clean -Trace™ Hygiene Monitoring Tests

## Sample Handling / Media



3M™ Sample Handling Supplies

## Pathogen & Toxin Testing

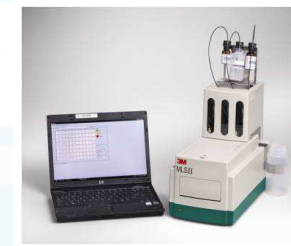


3M™ Molecular Detection System



3M™ Tecra™ Pathogen Tests

## End-Product Screening



3M™ Microbial Luminescence System



## 2. Využití ATP systémů pro kontrolu prostředí







## Luminometr NG

- Přenosný přístroj pro snadné analýzy v provozním prostředí
- V případě nevyhovujících výsledků lze měření opakovat
- Vhodný pro zavedení do HACCP





# Sledování hygieny prostřednictvím testů ATP přístrojem **3M NG**

- Zjištění živých buněk a zbytků organického substrátu
- Test, který poskytuje rychlý výsledek a umožňuje přistoupit okamžitě k nápravným opatřením.
- Sníží tak významně rizika mikrobiologických problémů v důsledku nedokonalého čištění a křížové kontaminace.
- **Hlavní výhoda = RYCHLOST**

## Postup měření

- Stěrová pera dvojího typu – pro povrchy a oplachové vody
- Jednoduchý postup ve 3 krocích



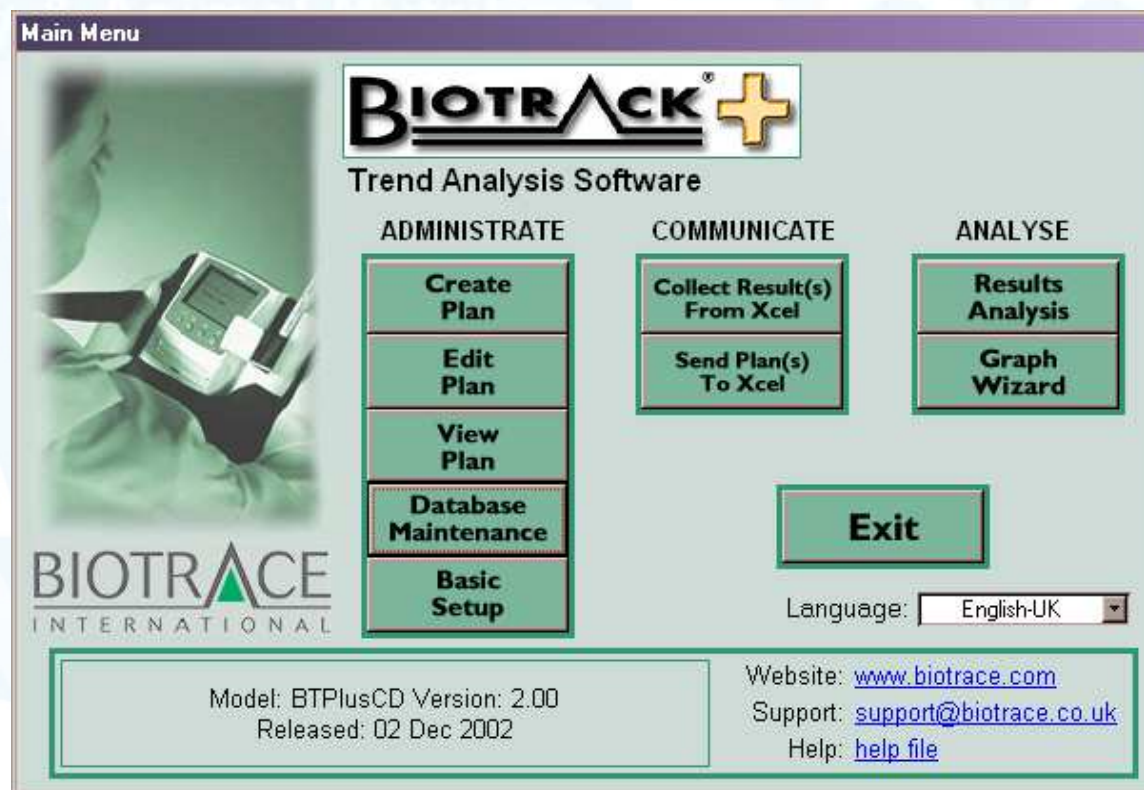


## Možné využití kontroly ATP

- Klimatizace, chladicí zařízení
- Papírenský průmysl
- Mlékárenství, masný průmysl
- Výroba nealkoholických nápojů
- Pivovarnictví
- Vinařství
- Výroba pitné vody, kontrola bazénových vod
- Zdravotnická zařízení, automobilky



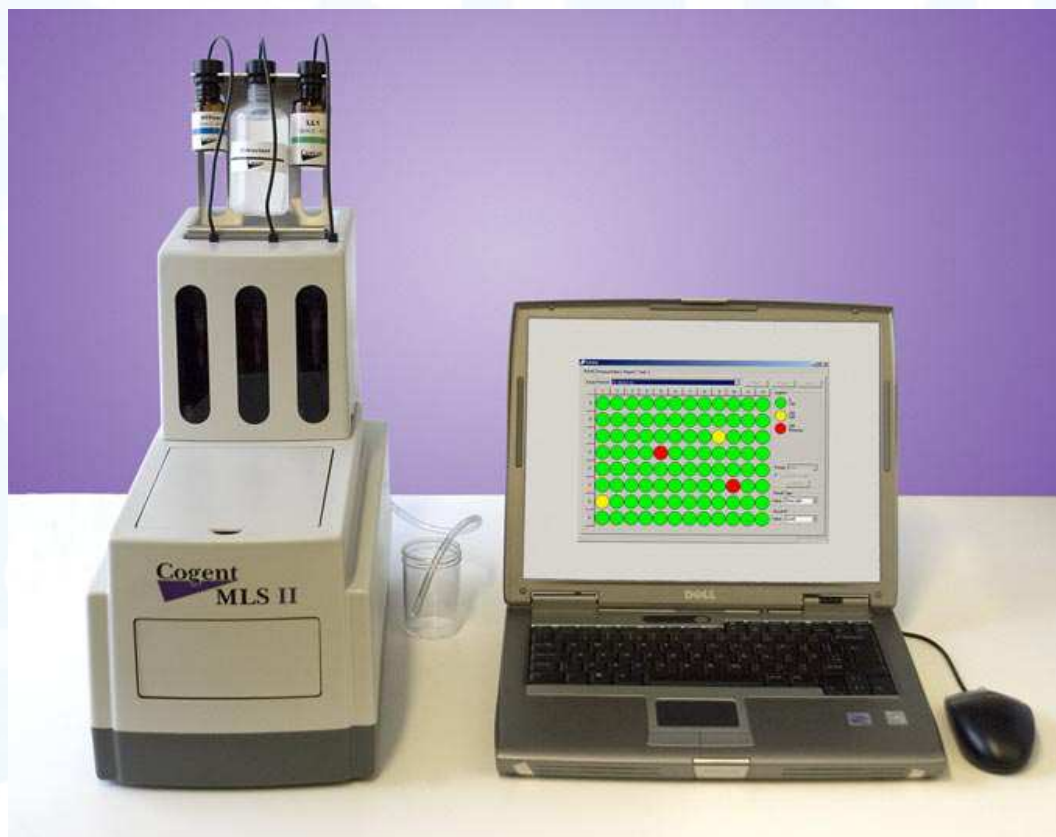
# Software pro tvorbu plánů měření a hodnocení naměřených dat





## 3. ATP systémy pro kontrolu UHT výrobků

**3M** MLS II





## MLS II Úvod

- Metoda určená pro kontrolu sterility konečného produktu
- Detekce mikrobiální kontaminace konečného produktu
  - přítomnost x nepřítomnost MO
- Nejběžnější aplikací je kontrola UHT mléka
- Principem je ATP bioluminiscence v 96 jamkovém formátu
- Reagencie jsou navrženy speciálně pro detekci pouze mikrobiální ATP

## Výhody pro uživatele

### PŘÍPRAVA VZORKU

### TEST

### VÝSLEDEK

- **Tradiční mikrobiologické metody**

48 až 72 hodin

48 až 96 hodin

- **ATP Bioluminescence**

48 až 72 hodin

**40 minut**

## Výhody pro uživatele

- Časová úspora 2 – 3 dny, výrobky jsou rychleji uvedeny do oběhu



- Snížení nároků a nákladů na skladování
- Zrychlení expedice zboží
- Zvýšení obrátu výrobků i financí
- Vysoká bezpečnost finálního výrobku

## Princip ATP Bioluminescence

- Všechny buňky obsahují ATP (adenosin-5'–trifosfát), který je zdrojem energie pro buněčný metabolismus
- ATP může být použit jako ukazatel úrovně biologické kontaminace (NGIII) nebo mikrobiální kontaminace (MLSII)
- Při kontaktu ATP se specifickým enzymem (Luciferin / Luciferáza) nastane chemická reakce, při které dochází k uvolnění kvant světelného záření





## Princip ATP Bioluminescence

- Množství světla produkovaného touto reakcí je vyjádřeno v jednotkách RLU (Relative Light Units)
  - Přímě úměrné množství detekovaného světla
  - Přímě úměrné množství ATP ve vzorku
  - Přímě úměrné množství přítomných živých buněk
  - Pomocí RLU určíme množství živých buněk ve vzorku

## Zdroje ATP v mléce

- Volná ATP
  - ATP obsažená volně v plazmě
- Somatická ATP
  - ATP obsažená v buňkách s jednoduchou membránou (somatické buňky)
- Mikrobiální ATP
  - ATP obsažená v mikrobiálních buňkách



## Doporučené aplikace

- Sterilní produkty (tetrapak)
- UHT mléko

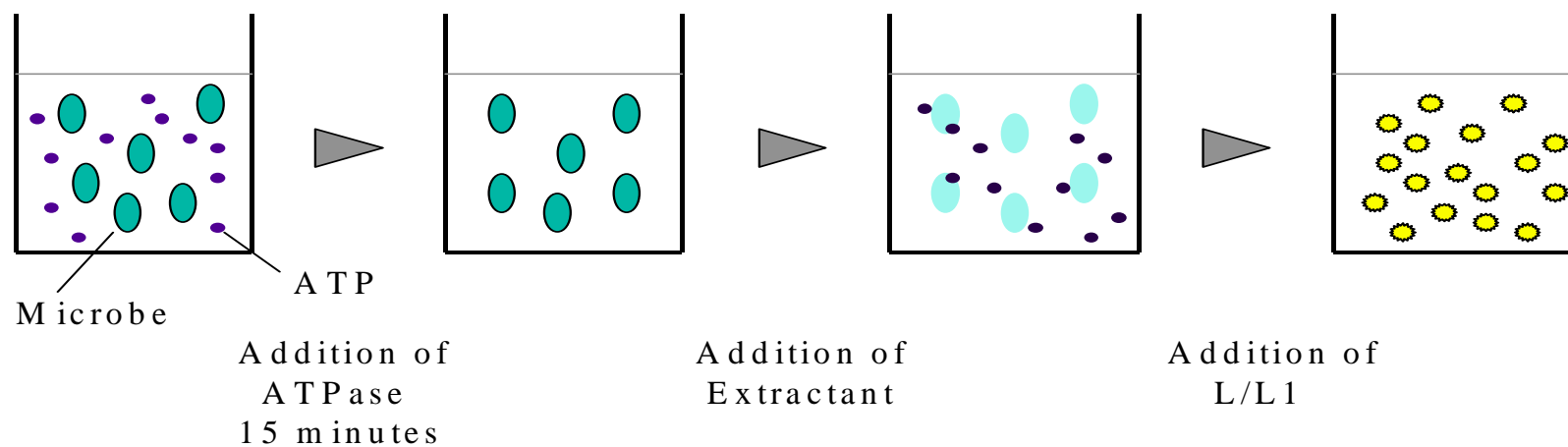
(mléko, sojové mléko, ochucené mléko, smetana 18 – 40 %, zmrzlinové směsi, pudinky...)

- Potenciální aplikace (džusy s prodlouženou životností, farmaceutický průmysl, produkty osobní hygieny..)

## Průběh reakce u UHT mléka

- ATPáza
  - zničení volné ATP
- Extraktant
  - uvolnění ATP z mikrobiálních buněk
- Luciferin / Luciferáza
  - vlastní reakce s uvolněnou mikrobiální ATP za vzniku světelného záření

## Průběh reakce u UHT mléka





## Průběh reakce u UHT mléka

- Vzorek
  - 50  $\mu$ l vzorku do každé mikrojamky
  - vložení destičky do přístroje
  - vše ostatní je již plně automatické
- ATPaza
  - do každé jamky je vstříknuto 50  $\mu$ l ATPázy
  - reakce probíhá 15 minut (plně automaticky)
- Extraktant
  - Do každé jamky je vstříknuto 95  $\mu$ l extraktantu
- L/L1

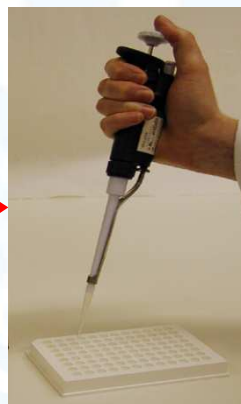
## Průběh reakce u UHT mléka



Inkubace



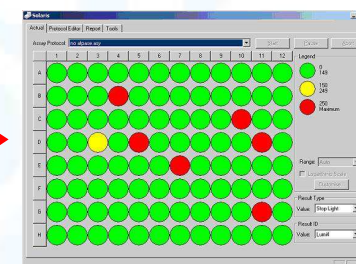
Promíchání



50 µl vzorku

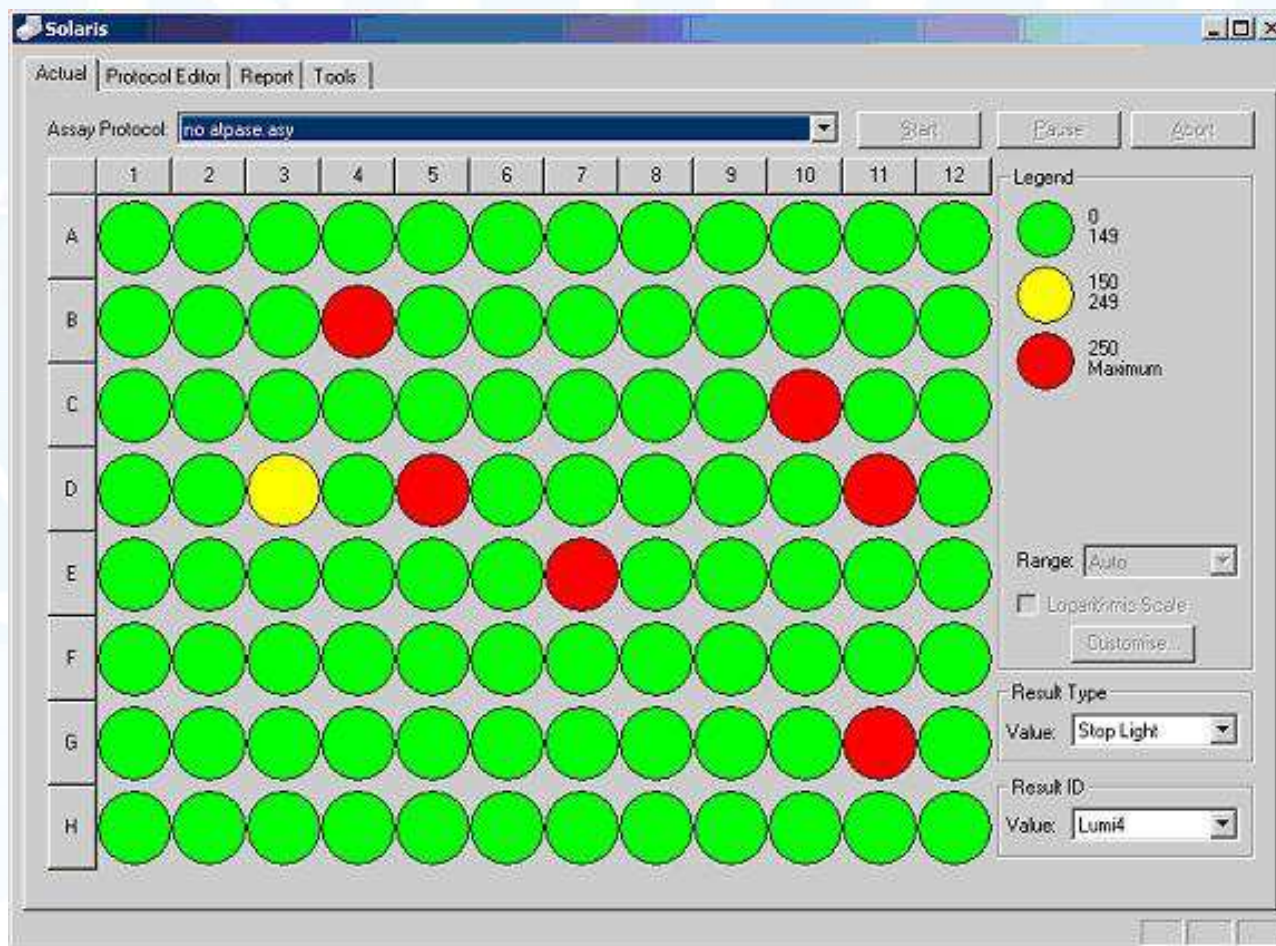


Vložení do přístroje



Výsledky v reálné čase

# Uživatelské rozhraní přístroje





## Uživatelské rozhraní přístroje

- Software pro zpracování a archivaci výsledků

### 3M Data Trending Software

- Přehledné zobrazení průběhu měření
- Automatická tvorba grafických a textových reportů
- Přehledné hledání v databázi výsledků
- Export dat do MS Office (Excel, Word)





## 4. Molecular Detection System

November 2011



Andrea Docekal / 3M Alpine Region

Agro-Food Diagnostics

AUSTRIA BULGARIA CROATIA CZECH REPUBLIC HUNGARY POLAND ROMANIA SERBIA SLOVAKIA SLOVENIA



# MDS - Molecular Detection System

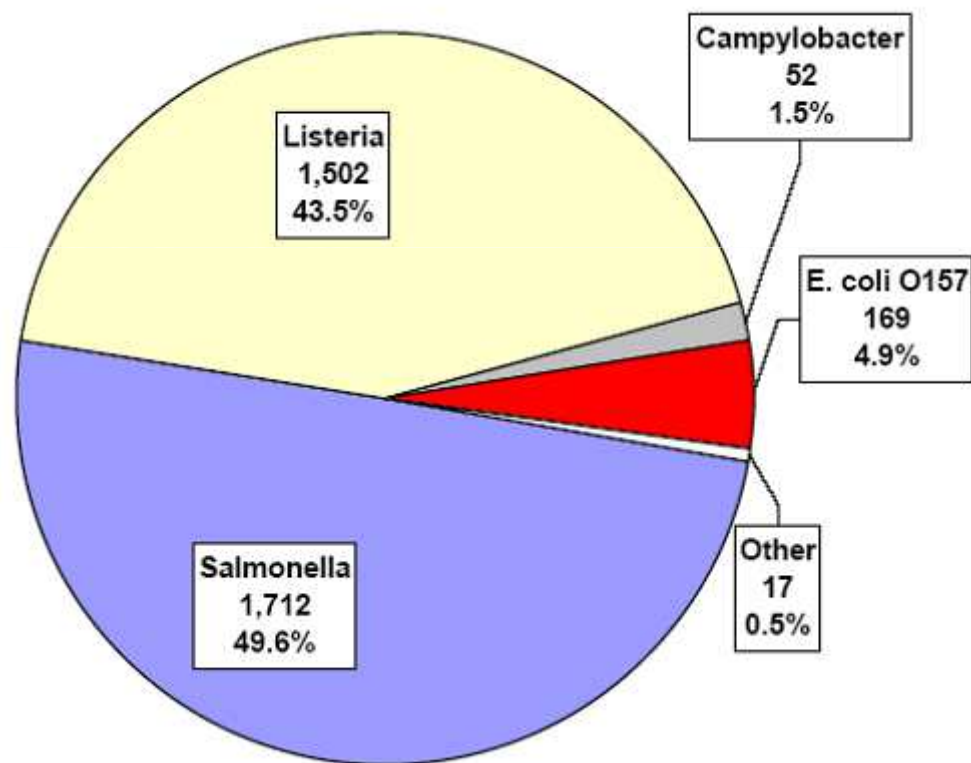
Mikrobiologické rozbory současnosti:

1. Tlak na rychlost výsledku – rychlé uvolnění expedice
2. Nárůst práce x pokles pracovníků – zvyšování produktivity
3. Zvýšená citlivost konzumentů na kvalitu – PR značky
4. Snižování nákladů na výrobu – náklady a produktivita



# MDS - Molecular Detection System

- Celosvětová struktura testování patogenů (v mil.)





# MDS - Molecular Detection System inovace

Salmonella

Listeria

E.coli O157:H7

Izotermální  
amplifikace DNA

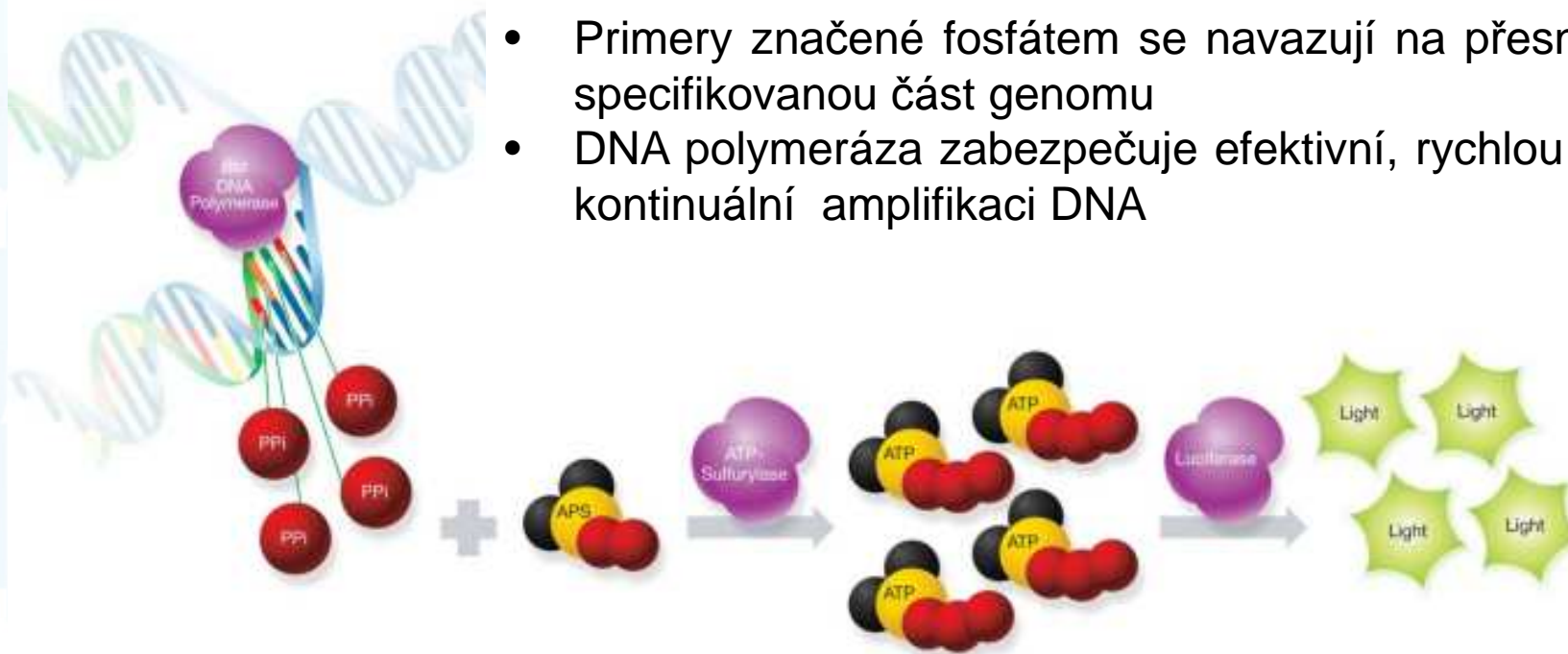
Bioluminiscenční  
detekce



# MDS - Molecular Detection System

## Izotermální amplifikace DNA

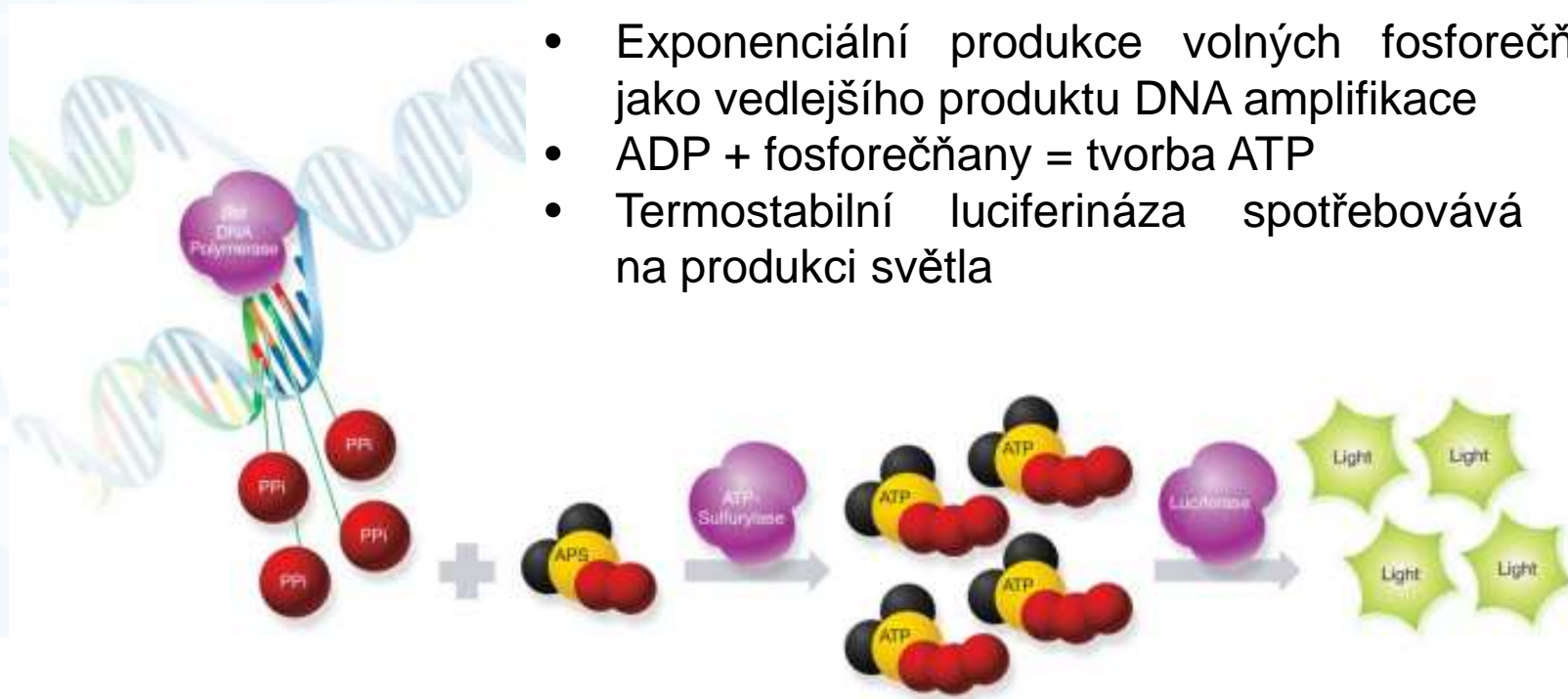
- Primery značené fosfátem se navazují na přesně specifikovanou část genomu
- DNA polymeráza zabezpečuje efektivní, rychlou a kontinuální amplifikaci DNA



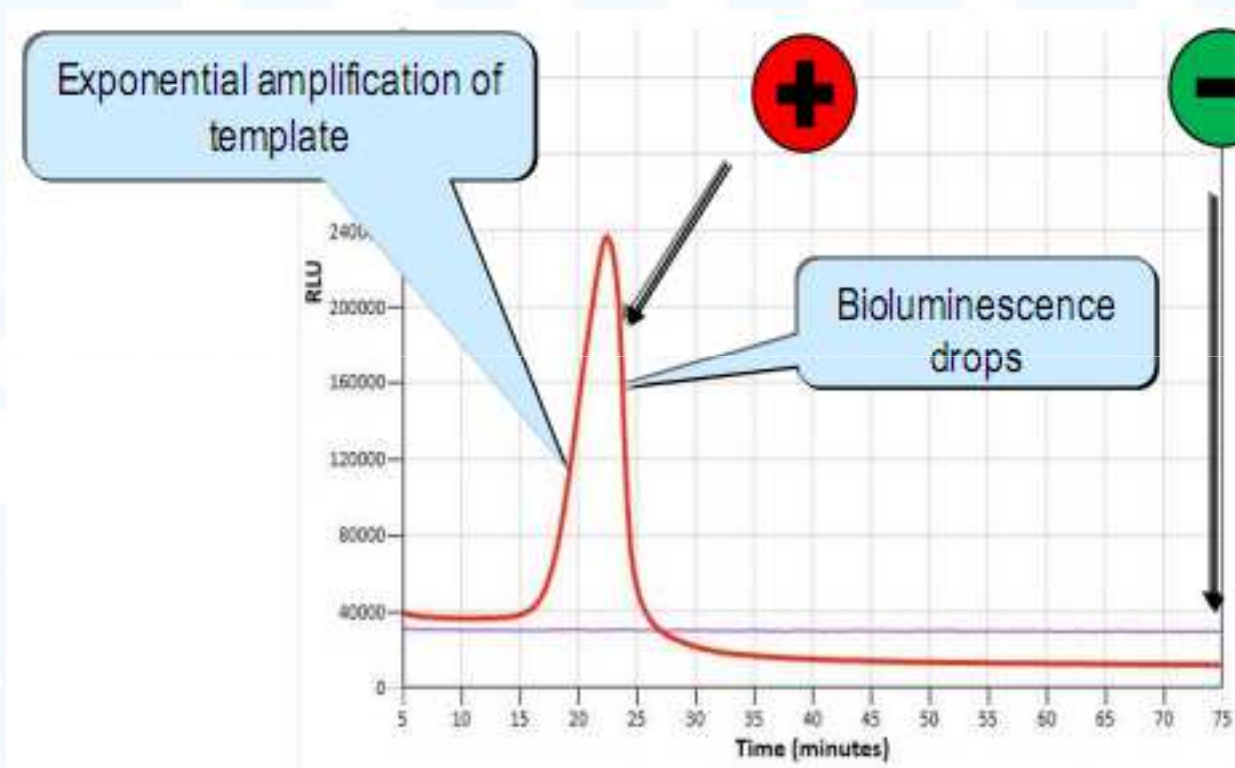
# MDS - Molecular Detection System

## Bioluminiscenční detekce

- Exponenciální produkce volných fosforečnanů, jako vedlejšího produktu DNA amplifikace
- ADP + fosforečnany = tvorba ATP
- Termostabilní luciferináza spotřebovává ATP na produkci světla



## MDS - Molecular Detection System



**Pozitivní vzorek cca 15-25 min.**

**Negativní vzorek 75 min.**



# MDS - Molecular Detection System



**Malé, jednoduché, lehké a výkonné  
zařízení**





## MDS – dostupné kity 96 jamek

- Salmonella
- Listeria spp.
- Listeria monocytogenes
- E. coli O157:H7





# MDS - kit



Náhradní víčka

Lyzační zkušavky

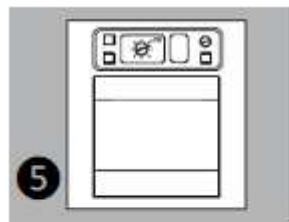
Reagenční zkušavky

Kontrola reagencií

Negativní kontrola



## MDS - Molecular Detection System



20  $\mu$ l vzorku



Lýza při 100 °C,  
15 min.



1. Příprava vzorku a  
**neselektivní** pomnožení

## MDS - Molecular Detection System



**4. Přenos do reakčních jamek**



**5. Uzavření a  
vložení do nosiče**

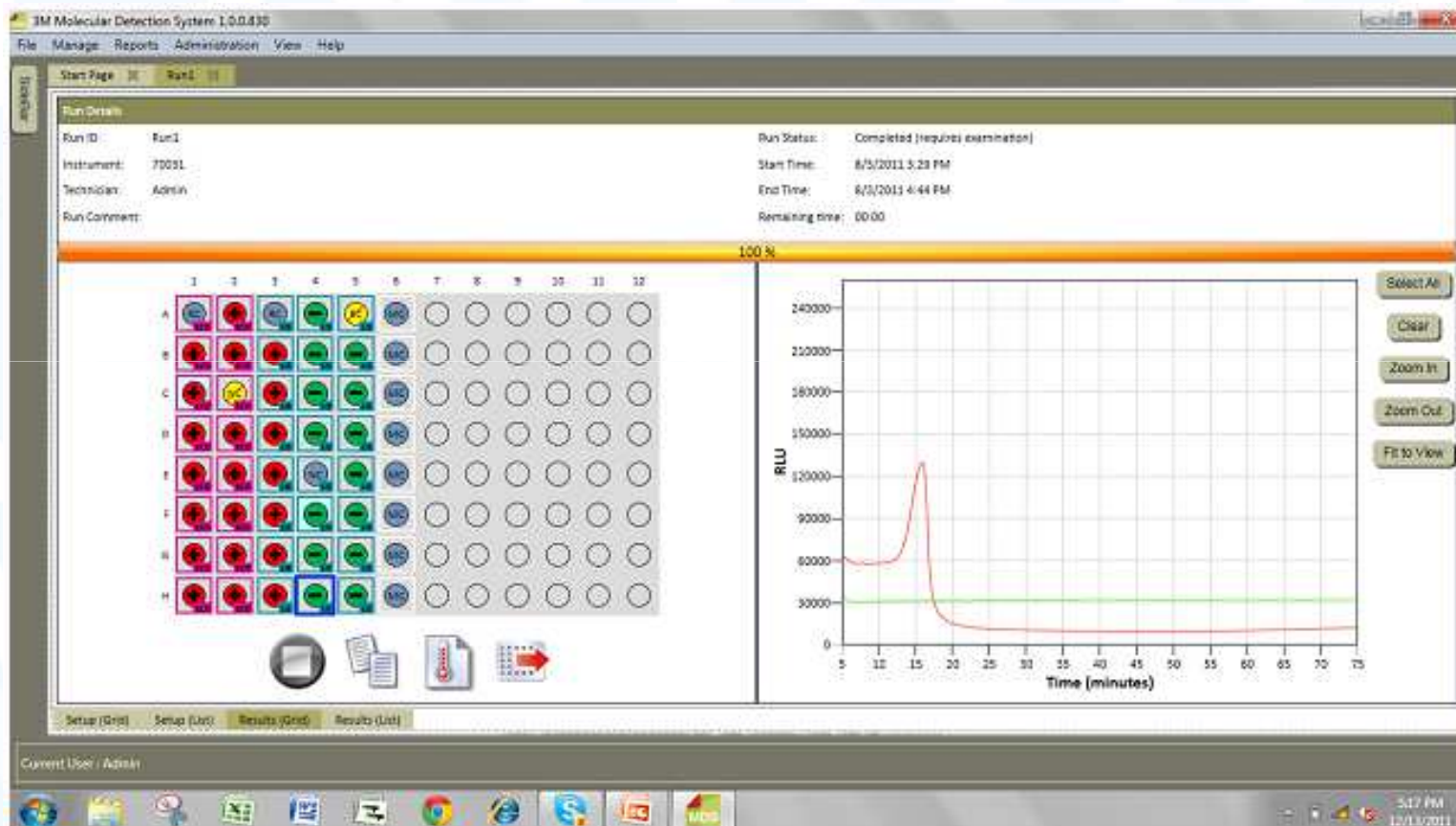


**6. Vložení do  
přístroje**





# MDS - Molecular Detection System



**Zmáčkneme Start a čekáme 75 min. na výsledky**



# MDS - Molecular Detection System

## Výhody:

- Maximální jednoduchost
- Maximální rychlost výsledku (24 hodin)
- Citlivost 1-5 KTJ / 25 g vzorku
- Jednoduchý přístroj bez pohyblivých (poruchových) částí
- Jednoduchý intuitivní software
- Možnost současné analýzy všech patogenů najednou
- Validace AOAC, AFNOR







# Děkuji za pozornost

Martin Polách  
NOACK ČR, spol. s r. o.