

ATP alapú és molekuláris technikák az élelmiszerbiztonság szolgálatában

Mráz Balázs
Bentley Magyarország Kft.



Gyorstesztek és az önellenőrzés – Elvárások

- Gyors
- Kellően érzékeny
- Takarékos (munka/anyag/eszköz)
- Egyszerű (!!!)
- Elfogadott (hatóság, partner)

Egyes önellenőrzésben használható módszerek időigénye

	Vizuális szemrevételezés	Mikrobiológiai módszerek	ATP ellenőrzés
Gyors?	++	---	++
Érzékeny?	---	++	++
Termék maradványainak kimutatása?	+	--	++
Egyszerű?	++	--	++

Mi az ATP?

Az ATP rövidítés jelentése Adenozin-trifoszfát, amely az élő szervezetek, növényi és állati sejtek energiaforrása.

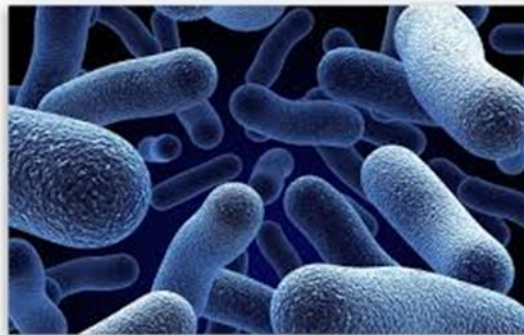
Amennyiben ATP találunk egy elvileg tiszta felületen, az azt jelenti, hogy nem volt megfelelő a takarítás.

Az ATP forrásai:

Élelmiszerek



Mikroorganizmusok

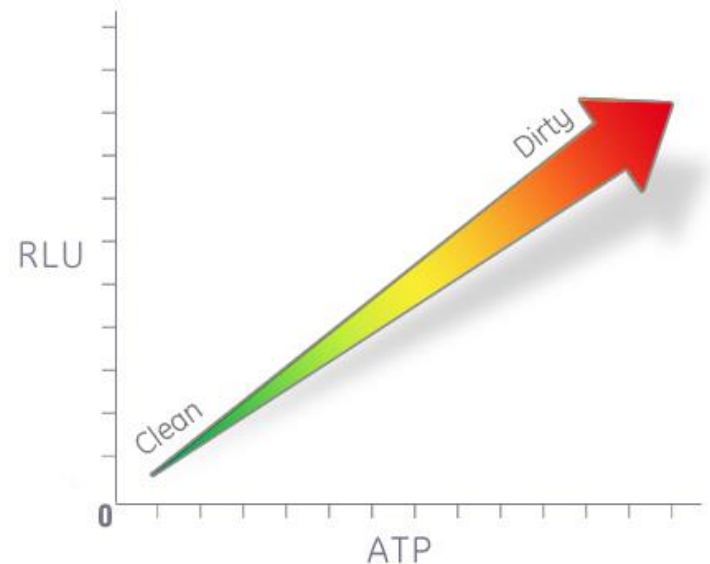


Emberek



A mérés elve

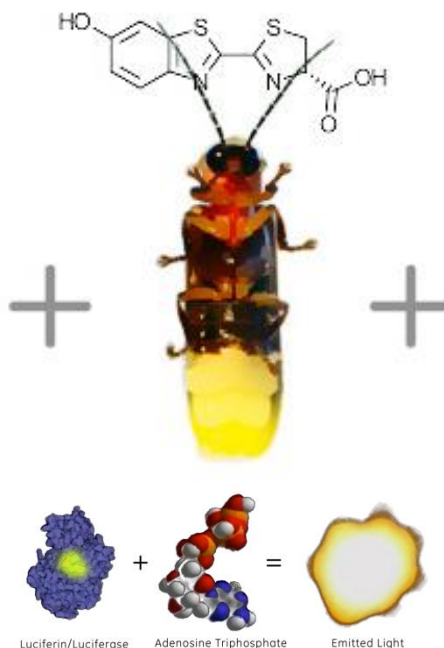
- Az ATP kimutatása biolumineszcenz reakció segítségével történik.
- Az ATP reagál a luciferin/luciferáz enzim komplexszel, ami fényreakciót generál. Ez a fény mennyiség mérhető egy erre érzékeny, speciális luminométerrel.
- Az ATP teszt az egyik legkedveltebb gyors teszt a világban a tisztaság hatékonyságának meghatározására.
- Minél szennyeződés van jelen, annál több ATP-t észlel, és egyre magasabb a kibocsátott fény mennyisége.



3 fontos
komponens:



1., Leolvasó készülék
(luminométer)



2. biolumineszcenciai
reagensek

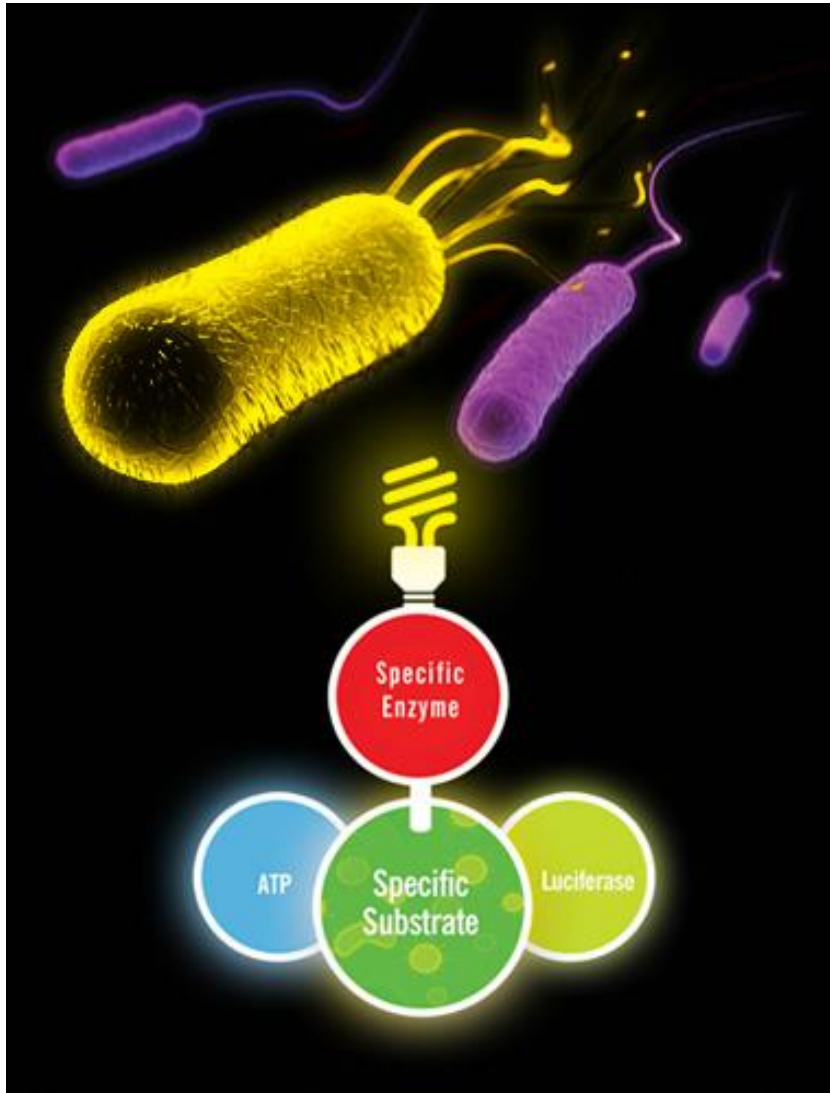


3. tesztcső

UltraSnap™ SuperSnap™ AquaSnap™

- 15 másodperc alatt ad eredményt
- rendkívüli érzékenység
- hatékony, könnyen használható





- enzim detektálás
- biolumineszcencia
- számszerűsíthető
- érzékeny
- pontos
- gyors
- kényelmes

MicroSnapTM

Total

- AOAC-RI PTMSM validálás (#031501)
- azonos rendszer termékekre és felületek
- Számmeghatározás: 7 óra alatt
- **A leggyorsabb jóváhagyott teszt!**



MicroSnapTM

Total



MicroSnapTM Coliform & *E. coli*



- AOAC-RI PTMSM validálás (#071302)
- azonos rendszer termékekre és felületek
- Számmeghatározás: 6 óra
- jelenlét/hiány: 8 óra
- **A leggyorsabb jóváhagyott teszt!**



	Total	Coliform	E.coli	Enterobacter
Validáció	AOAC – PTM	AOAC – PTM	AOAC – PTM	folyamatban
Metodika	Dúsítás → lumineszcens detektálás			
Mátrix	Termékek és felületek			
Eredmény ideje	7 óra	6 – 8 óra	6 – 8 óra	6 – 7 – 8 óra
Kimutatási határ	<10 CFU	1 CFU	1 CFU	1 CFU

Validált mátrixok

tej, tejtermék, csirkehús, marhahús, hal, saláta, szendvics, krémes torta
stb.

Néhány hagyományos módszer időigénye

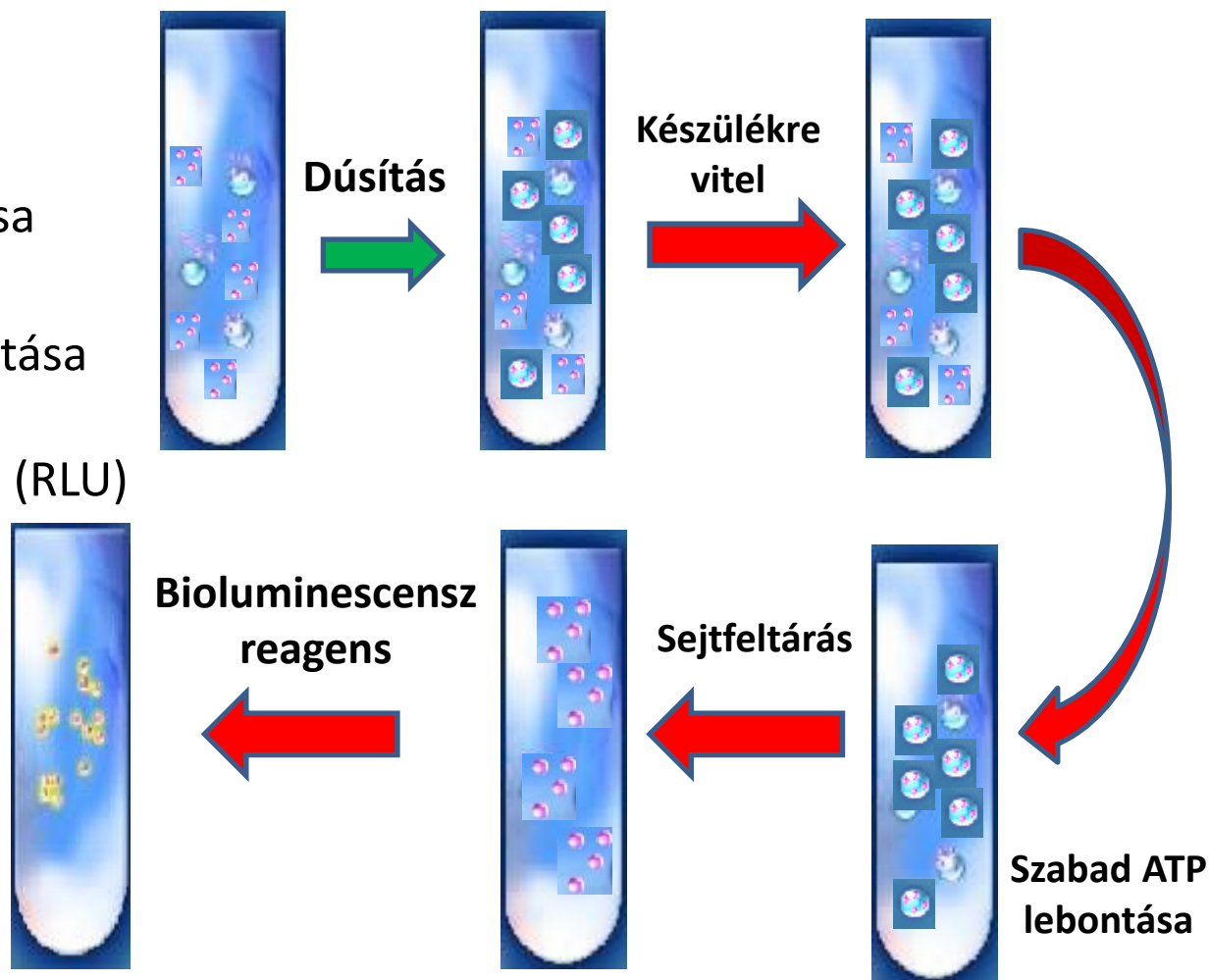
Paraméter	Hagyományos teszt ideje	Vonatkozó szabvány
Összmikróbaszám	min 72 óra	MSZ EN ISO 4833
Enterobacter szám	min. 18 óra	MSZ ISO 21528
Coliform szám	min. 22 óra	ISO 4832
E. coli szám	min. 18 óra	MSZ ISO 16649
Salmonella jelenlét	min. 72 óra	MSZ EN ISO 6579
Listeria monocytogenes jelenlét	min. 96 óra	MSZ EN ISO 11290

- Az Innovate, egy nagy kapacitású asztali készülék.
 - akár 96 minta egyidejű vizsgálata
 - Nagy érzékenységű biolumineszcens detektor, egy reagens pipettázó robottal kombinálva.



Vizsgálat lépései:

1. Dúsítás: 24 – 48 óra
mikrobacejtek szaporítása
2. Mérés: 30 perc
 - minta háttér ATP lebontása
 - sejtek feltárása
 - ATP mennyiség mérése (RLU)
3. Eredményközlés



Vizsgálható mátrixok:

UHT tej, ESL tej, puding, tejszín, tejföl, kakaós tej, bébi tápszer, fehérjeital, jégkrém mixek, szószok, zöldség-, és gyümölcslevek, tea, levesek



	Hagyományos	PCR
Elődúsítás	18 – 24 h	Salmonella 8 – 24 (+3) h Listeria 22 – 28 h
Szelektív dúsítás	24 – 48 h	Salmonella – Listeria 18 – 24 (+3) h
Szelektív tápközeg	24 – 48 h	-
Megerősítő vizsgálatok	Min. 24 – 48 h	-

Cél: a negatív eredményt a lehető legkorábban kommunikálni

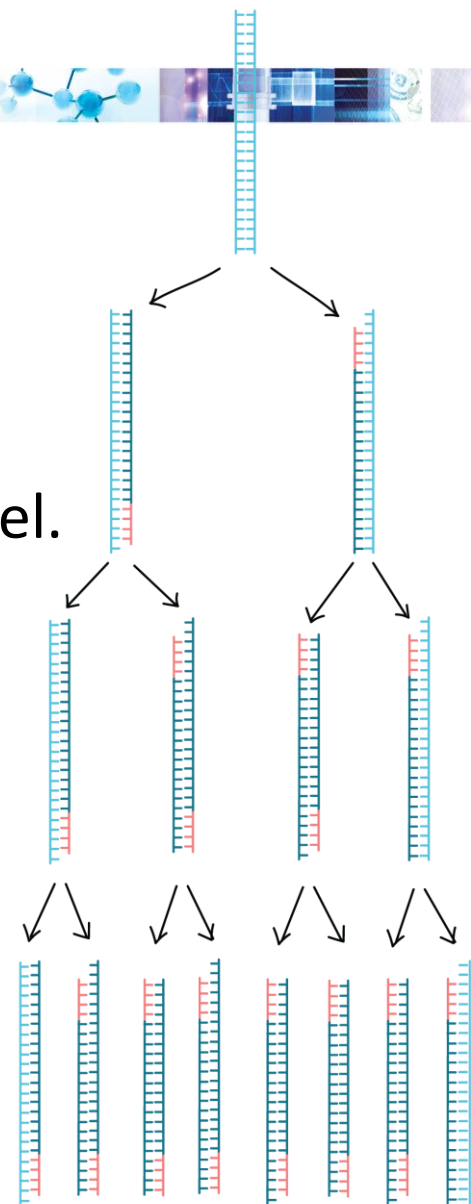
Felfedezése 1983, Kary Mullis

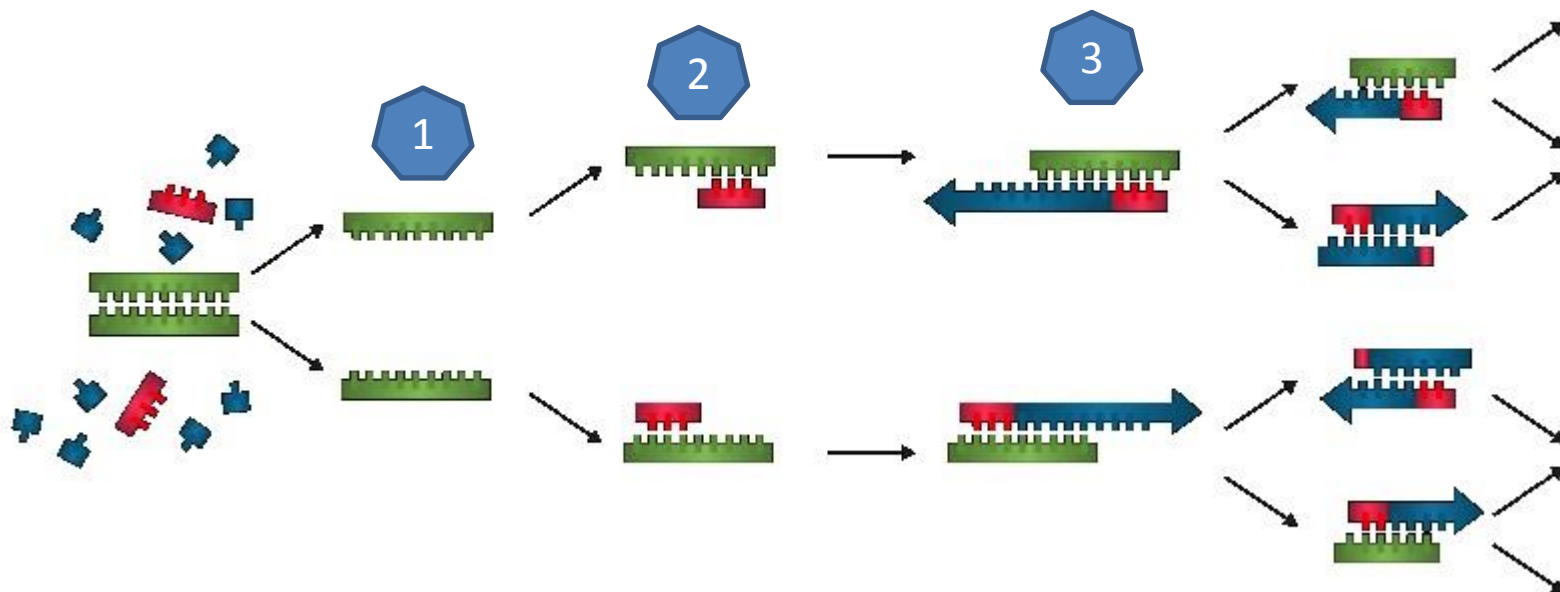
Ismert DNS szekvenciájú szakasz *in vitro*

Felerősíthető egy ciklikusan ismétlődő módszerrel.

Szükséges vegyületek:

- legalább 1 db cél DNS molekula
- Hőstabil polimeráz enzim
- primerek (szintetikus)
- Nukleotid bázisok (dNTP)
- Anionok





1. Denaturálás (T: $>90^{\circ}\text{C}$) A hőmérséklet emelésével a DNS szálak szétválnak.

2. Annealing (T: $\sim 50^{\circ}\text{C}$) A hőmérséklet csökkenésével a primerek a DNS szálakhoz kötődnek

3. Lánc hosszabbítás T: 72°C

A DNS-polimeráz enzim hőmérsékleti optimumán megtörténik a célzott DNS szakasz megkettőződése

- Végpontjelzéses PCR

A folyamat végén (pl. 40 ciklus) után mérjük a fluoreszcens jelet.

Jelenlét / **Hiány** tesztek

- Real-time PCR

A specifikus DNS szakaszok felszaporítása és detektálása egy időben történik.

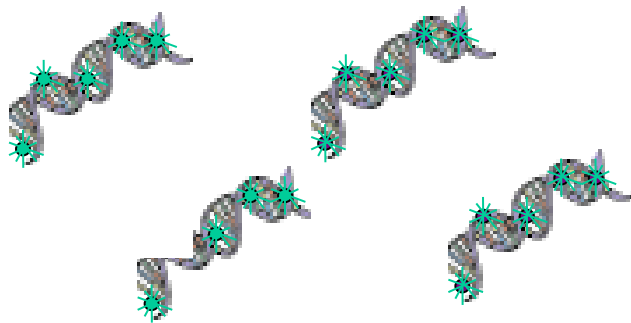
Kvantitatív meghatározás is lehetséges

A DNS „olvadásával” a szálak szétválnak.

Az interkaláló festék fluoreszcens jele a hőmérséklet emelkedésével csökken (pl. SYBR Green)

Az interkaláló festék a kétszálú DNS-hez kötődve fluoreszcens jelet ad

A DNS-hez nem kötött festék nem ad jelet

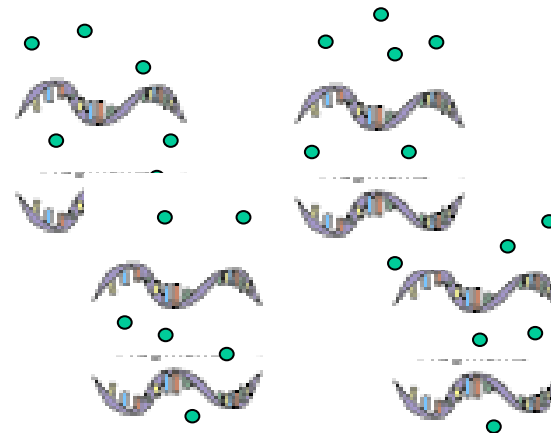


Jel

Emelkedő hőmérséklet

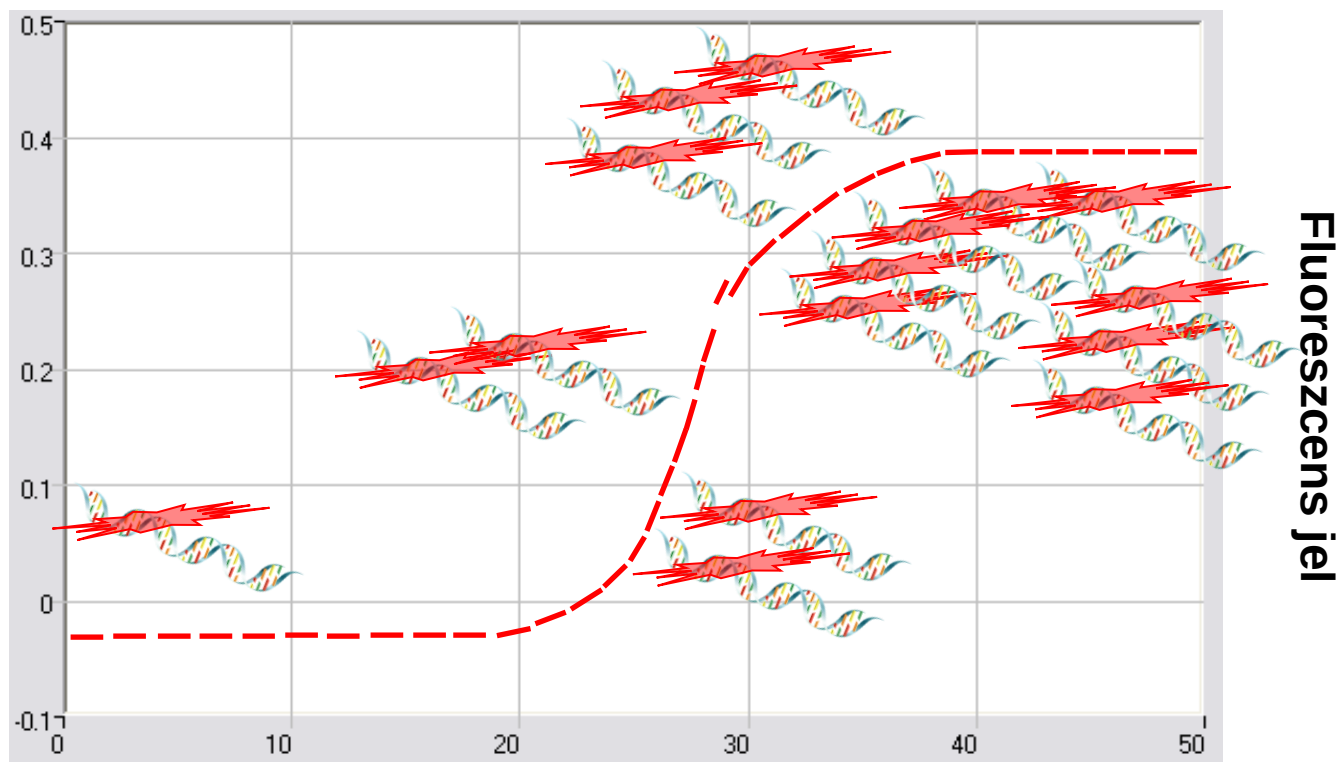


Nincs Jel

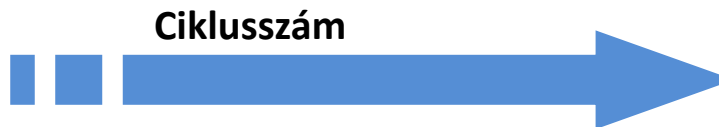


A fluoreszcens jel a ciklusok előrehaladtával növekszik, amennyiben jelen van a célzott DNS.

Szoftveresen történik a mikrobaszám meghatározása a szigmoid görbe alapján.



Nincs jel



Jel

✓ **Minden PCR-hoz szükséges reagens a csőben**

- Taq polimeráz
- Nukleotidok
- Primerek
- Pozitív belső kontrol
- Fluoreszens festék

- **PCR csövekbe csomagolva**
- **Beépített folyamatkontroll**
- **Nincs szükség többszörös reagens adagolásra**
- **Csökken a pipettázási hibalehetőség**
- **PCR-t stabilizáló anyagok a mátrix gátlóhatásának megelőzésére**
- **A zárt reakciócsövek csökkentik az amplikon-szennyezés lehetőségét**



BAX[®] Standard PCR tesztek (Végpont jelzéses PCR):

- Olvadási görbe elemzés, folyamat ideje 3.5 óra.
- A számítógépes algoritmus + vagy – eredményt ad.
- *Salmonella*, *Listeria* Genus 24E, *Listeria monocytogenes* 24E, Yeast & Mould, *Enterobacter sakazakii*

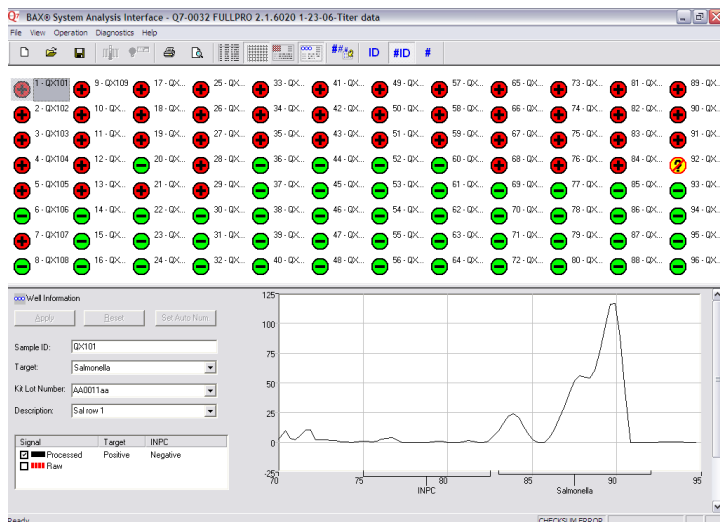
BAX[®] Real Time PCR tesztek:

5 festék csatorna többféle próba alkalmazását teszi lehetővé egy reakciónál. A folyamat ideje 55-90 perc.

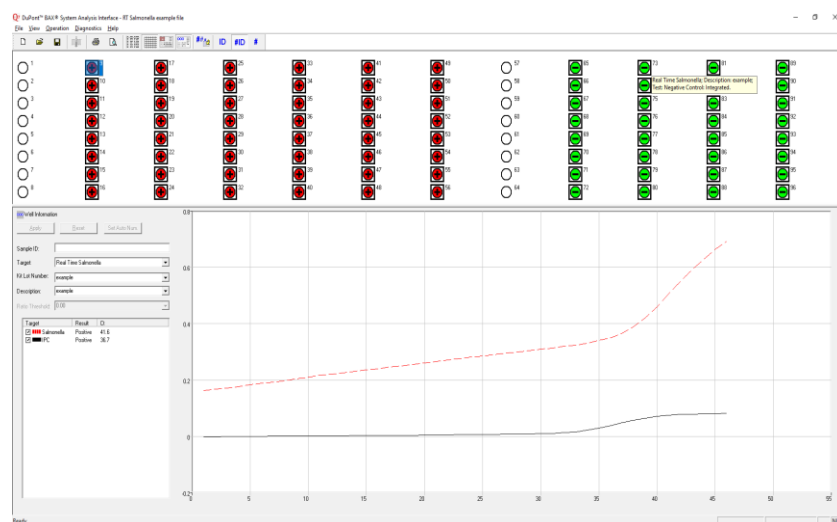
Kvalitatív és kvantitativ információ egyaránt nyerhető vele.

Campylobacter coli/jejuni/lari, *Staph. aureus*, *Vibrio vul/para/cholerae*, *E. coli* O157:H7, *STEC*, *Salmonella* spp, *Shigella*, Genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*

Standard BAX[®] kit



Real-Time BAX[®] kit



Hatósági jóváhagyások



USA



Brazília



Kínai Népköztársaság



Kanada



Dánia



Japán

Validációk

AOAC International



AOAC Research
Institute



AFNOR



NordVal



Módszer átvétel

USDA-FSIS



Köszönöm megtisztelő figyelmüket!