

Aktualności

bioMérieux



Kontrola jakości w każdych warunkach

Spis treści

- 2 od wydawcy
- 3 Szybkie badania mikrobiologiczne kosmetyków oraz produktów do higieny osobistej z wykorzystaniem technologii CHEMUNEX® we współpracy z Yves Saint Laurent
- 7 Cytometria przepływowa w analizie żywności
- 8 Przydatność systemu TEMPO® do monitorowania czystości mikrobiologicznej surowców barwnych
- 12 Automatykacja pracy laboratorium – nowoczesne rozwiązania
- 13 Labguard – system monitoringu parametrów fizycznych
- 15 PREVI ColotGram – automatyczne barwienie preparatów metodą Grama

wydawca: bioMérieux Polska Sp. z o.o.

Osoba odpowiedzialna: Elżbieta Wójcik

Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 16:

Dorota Pawluch
Artur Gąsior
Czesław Mitek
Jacek Charliński
Aneta Lesiuk (korekta)

Adres redakcji i wydawcy:

bioMérieux Polska
01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajączka 9
tel. (22) 569 85 00 • fax (22) 569 85 54
www.biomerieux.pl

opracowanie graficzne i druk:

Agencja Wydawnicza SOWA
www.agencja-sowa.com.pl

od wydawcy

Szanowni Państwo,

Mam nadzieję, że artykuły, które zamieściliśmy w numerze 16 „Aktualności Industry”, spełniają Państwa oczekiwania. Bardzo prosimy o opinie, które będą dla nas wskazaniem, co powinniśmy zmienić w przyszłości i jakie tematy są dla Państwa ważne.

Nowe instrumentalne metody analizy mikrobiologicznej kosmetyków i żywności przybliży Państwu Pani Dr hab. Alina Kunicka Styczyńska. Tempo, o którym mogli Państwo przeczytać w poprzednich numerach, może być wykorzystane również do monitorowania czystości mikrobiologicznej surowców barwnych. Artykuł na ten temat znajdziecie Państwo na stronie 8.

bioMérieux wprowadziło na rynek polski nowy system do monitorowania i śledzenia temperatur oraz innych parametrów fizycznych kontrolowanych w laboratoriach, chłodniach czy liniach produkcyjnych o nazwie: LABGUARD. Więcej na temat tego systemu mogą Państwo przeczytać w obecnym numerze.

W numerze 16 Aktualności Industry, znajdziecie Państwo również informacje na temat systemu do automatycznego barwienia preparatów metodą Grama.

Współczesne laboratoria mikrobiologiczne w coraz większym stopniu dążą do skracania czasu trwania procesów jednostkowych, redukcji czynności manualnych w celu poprawienia efektywności oraz zwiększenia przepustowości laboratorium. Stąd duże zainteresowanie automatyzacją pracy oraz zwiększaniem wydajności. W Aktualnościach przedstawiamy nowe DILUMATY bioMérieux: Dilumat START, Expert i EVO.

Serdecznie zapraszamy Państwa do odwiedzania naszej strony internetowej www.biomerieux.pl, oraz zarejestrowania się do naszej biblioteki technicznej na stronie: www.mybiomerieux.com, dzięki której będziecie mieli Państwo dostęp do ulotek technicznych oraz Certyfikatów Kontroli Jakości naszych produktów.



Dorota Pawluch

Dyrektor ds. Marketingu i Sprzedaży
Mikrobiologia Przemysłowa

Szybkie badania mikrobiologiczne kosmetyków oraz produktów do higieny osobistej z wykorzystaniem technologii CHEMUNEX® we współpracy z Yves Saint Laurent

Zakłady produkujące kosmetyki oraz środki higieny osobistej wykonują badania mikrobiologiczne produktów przed wypuszczeniem ich na rynek. Rutynowo wykonują badania w kierunku oceny ilościowej OLD (Ogólna Liczba Drobnoustrojów), Drożdży i Pleśni oraz testy na Obecność/Nieobecność pewnych, specyficznych mikroorganizmów.

Dzięki systemowi D-Count®, technologii CHEMUNEX opartej na cytometrii przepływowej, zakłady produkujące kosmetyki mogą zwalniać swoje produkty o 2 lub 3 dni wcześniej w porównaniu z tradycyjną metodą badań.

Yves Saint Laurent (YSL) kilka lat temu zaadaptował technologię CHEMUNEX do zwalniania końcowych produktów, z wykorzystaniem 24 godzinnego testu na Obecność/Nieobecność w kierunku OLD (Ogólna Liczba Drobnoustrojów).

W celu polepszenia jakości surowców zostało zawarte porozumienie pomiędzy YSL a CHEMUNEX, ukierunkowane na opracowanie szybkiego protokołu do wykrywania drożdży i pleśni. Protokół sprawdzono w badaniach z wykorzystaniem większości produktów YSL, takich jak szampony, toniki, pudry, kremy. Badania obejmowały etapy opisane w Farmakopei EU i US oraz w „The validation of compendial methods <1225>”, „The PDA Technical Report 33”.

Procedura walidacyjna zgodna była ze standardami określonymi dla Badań Zgodności (Performance Qualification - PQ).

Metody

Próbki (szampon, żel pod prysznic, tonik, puder, tusz do rzęs, krem do ciała, spray do włosów, oraz kremy do twarzy) przygotowano w następujący sposób:

10g produktu kosmetycznego (sztucznie kontaminowanego lub nie) dodano do 90ml bulionu ChemBoost C (bulion do neutralizacji konserwantów oraz namnażania,

dostarczony przez AES CHEMUNEX, stosowany również w aplikacji dla OLD)

Homogenizowano próbkę za pomocą mieszadła typu Vortex oraz inkubowano ją 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

Następnie dodawano 1ml zneutralizowanej próbki do 20 ml bulionu wzbogacającego (ChemBost F, specyficzny bulion wzbogacający dla drożdży i pleśni), który inkubowano 50 godzin w 25 +/- 2C w celu zwiększenia poziomu wykrywalności mikroorganizmów.

Po inkubacji próbki poddawane były homogenizacji w celu rozbicia obecnej grzybni, następnie filtrowane.

Kolejny etap to automatyczne znakowanie i analizowanie próbki w systemie D-Count z użyciem specyficznych odczynników znakujących tylko żywe mikroorganizmy.

Jedna seria badań wykonywana była w ciągu 45-60 minut, natomiast pierwszy wynik uzyskiwano po 20-25 minutach. W celu określenia Limitu Wykrywalności, każdy produkt sztucznie kontaminowano z użyciem pięciu różnych mikroorganizmów o różnym poziomie koncentracji zawiesiny (Tabela 1).

Tabela 1.

Koncentracja zawiesiny			
Szczep	Poziom 1	Poziom 2	Poziom 3
<i>Candida albicans</i>	0	5-10	50-100
<i>Aspergillus niger</i>	0	5-10	50-100
<i>Mucor plumbeus</i>	0	5-10	50-100
<i>Penicillium glabrum</i>	0	5-10	50-100
<i>Aureobasidium sp</i>	0	5-10	50-100

Równolegle w metodzie płytkowej sprawdzono koncentrację zawiesin: po 50 godzinnej inkubacji, 1ml próbki rozcieńczonej do 1/10 posiewano na agar Sabouraud z dekstrozą i inkubowano od 3 do pięciu dni w 25 C.

Wyniki i dyskusja

System cytometrii przepływowej firmy bioMérieux CHEMUNEX został zwalidowany aby wykazać spójność i pewność wyników w badaniach na obecność/nieobecność drożdży i pleśni szerokiego zakresu produktów, według zaleceń Farmakopei EU i US oraz PDA 33.

Specyficzność i Selektywność metody

Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość wykrywania szczepów drożdży i pleśni (Tabela 2) w teście na Obecność/Nieobecność oraz brak reakcji krzyżowych z drobnoustrojami niebędącymi drożdżami i pleśniami (Tabela 3) po 50 godzinnej inkubacji.

Tabela 2.

Specyficzność	
Drożdże	Pleśnie
<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Mucor plumbeus</i> <i>Penicillium glabrum</i> <i>Aureobasidium sp</i>

Tabela 3.

Selektywność	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter liquefaciens</i>
przetrawalniki <i>Bacillus subtilis</i>	Szczepy przemysłowe

Granica wykrywalności (LOD)

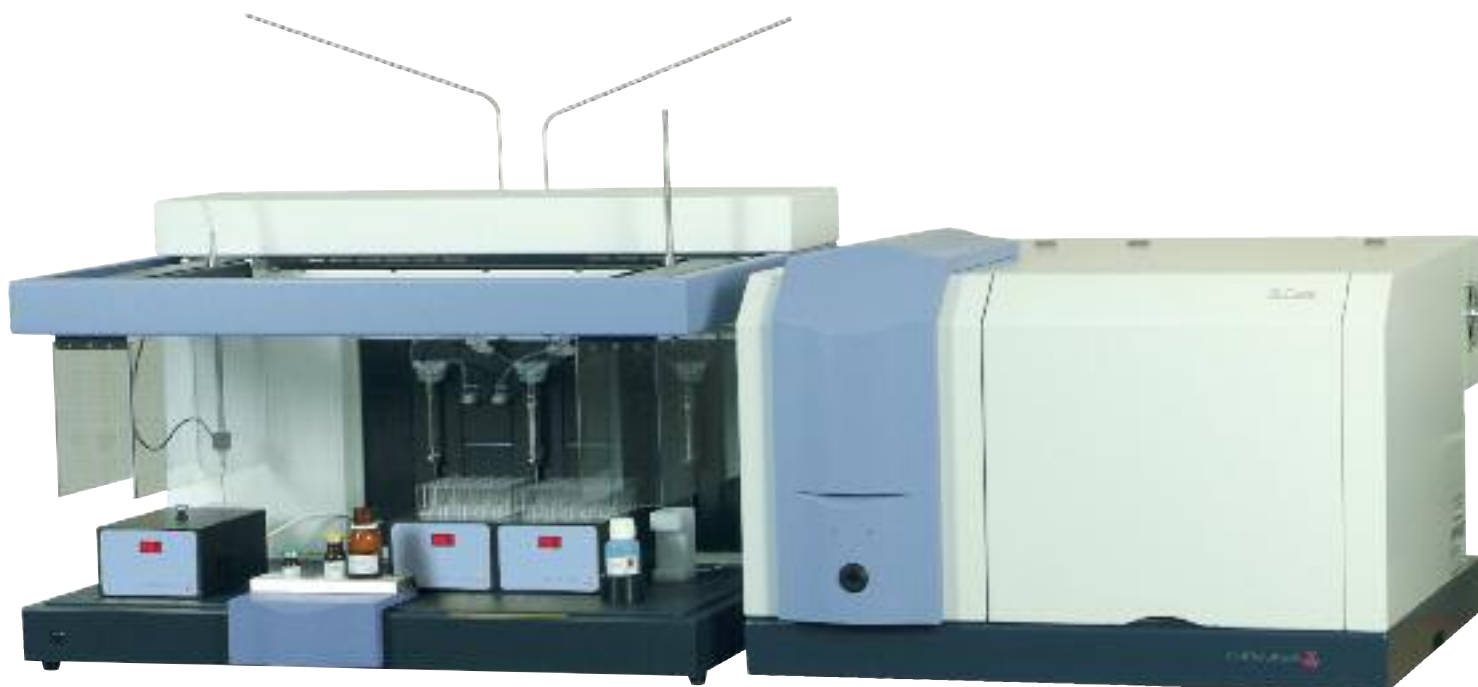
Granice wykrywalności (LOD) określa się jako najmniejszą liczbę drobnoustrojów możliwą do wykrycia, bez określenia dokładnej jej wartości liczbowej, przy 50 % przedziale ufności, w danych warunkach doświadczalnych. Poziomy koncentracji zawiesin dla każdego szczepu podano w tabeli 4.

Wskaźnik 50% Endpoint Spermana-Kabera stosowany jest do obliczania koncentracji drobnoustroju (oraz granicy przedziału ufności) w danej matrycy, który to przedział odpowiada 50% prawdopodobieństwu uzyskania wyniku dodatniego. Tabela 5 przedstawia 50% Granicę Wykrywalności (50% LOD) dla drożdży i pleśni w teście Obecny/Nieobecny, z użyciem hodowli czystych szczepów, po 50 godzinnej inkubacji w 25C, w bulionie ChemBoost F, w porównaniu z metodą referencyjną.



Korelacja wyników uzyskanych z użyciem systemu D-Count i metody płytkowej

Podczas równoległych, trwających 6 miesięcy badań z użyciem systemu D-Count i metody płytkowej przeprowadzonych w laboratorium YSL, wykonano 618 analiz próbek naturalnych oraz sztucznie kontaminowanych. Badania wykazały dobrą korelację pomiędzy systemem D-Count, a tradycyjną metodą płytkową, co przedstawia tabela 6.



D-Count – automatyczny cytometr przepływowy przeznaczony dla laboratoriów o średniej i dużej przepustowości próbek.

Tabela 4.

Koncentracja zawiesiny				
Szczep	Poziom 1	Poziom 2	Poziom 3	Poziom 4
<i>Candida albicans</i>	0	1,4	1,6	17
<i>Aspergillus niger</i>	0	0,3	0,9	19
<i>Penicillium glabrum</i>	0	0,5	1,1	14
<i>Mucor plumbeus</i>	0	0,9	2,4	15

Tabela 5.

Względny poziom wykrywalności (jtk/21 ml bulionu ChemBoost F)		
Szczep	Metoda referencyjna	Metoda alternatywna
<i>Candida albicans</i>	0,184 (0,063-0,542)	0,390 (0,109-1,398)
<i>Aspergillus niger</i>	0,410 (0,120-1,398)	0,384 (0,102-1,443)
<i>Penicillium glabrum</i>	0,225 (0,066- 0,769)	0,449 (0,132-1,532)
<i>Mucor plumbeus</i>	0,196 (0,057 – 0,668)	0,292 (0,082- 1,0460)

Tabela 6.

Zestawienie wyników			
	Wyniki ujemne w metodzie referencyjnej	Dodatnie wyniki w metodzie referencyjnej	Suma
Wyniki ujemne w D-Count	516	0	516
Wyniki dodatnie w D-Count	10	92	102
Suma	526	92	618

Wnioski

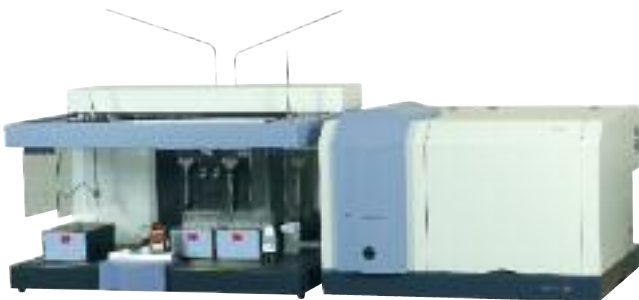
Wykazano możliwość zwalniania szerokiej gamy produktów YSL w ciągu 2 dni po badaniach w kierunku drożdży i pleśni. We wszystkich przypadkach uzyskane dane potwierdziły zgodność wyników uzyskanych w metodzie automatycznej po 50 godzinnej inkubacji w bulionie namnażającym, z metodą płytkową, w której wyniki uzyskiwane są po 5 dniach. D-Count umożliwia wykrywanie niskich poziomów drożdży i pleśni w badanych produktach. Nowy protokół do wykrywania drożdży i pleśni jest stosowany głównie w badaniach surowców z uwagi na ryzyko zanieczyszczenia pleśniami w porównaniu do gotowych produktów. Dlatego w laboratoriach YSL test na Obecność/Nieobecność ogólnej liczby drobnoustrojów pozostaje głównym kryterium w kontroli wyrobów gotowych. Dzięki badaniom na Obecność/Nieobecność bakterii oraz drożdży i pleśni laboratorium mikrobiologiczne YSL uzyskuje kompletne wyniki analiz dla końcowych produktów, w ciągu 24 godzin dla bakterii oraz dla surowców w ciągu 2 dni dla drożdży i pleśni. Dzięki temu YSL może zwalniać produkty od 3 do 5 dni szybciej w porównaniu z metodą tradycyjną.

Nowoczesne rozwiązania bioMérieux w badaniach mikrobiologicznych

D-Count® BactiFlow ALS®

Zwalniaj swoje produkty szybciej dzięki ultra szybkim wynikom

Sprawdzona technologia znakowania
tylko żywych komórek.
Wsparcie podczas badań walidacyjnych.



- Wykrywanie bakterii, drożdży oraz pleśni w żywności i kosmetykach – test na Obecność/Nieobecność
- Wysoka czułość: możliwość wykrywania 1 komórki w opakowaniu (żywność) lub 1 komórki na gram (kosmetyki)
- szybki, prosty i pewny odczyt wyników próbek o niskim oraz wysokim stopniu zanieczyszczenia
- Wyniki po 24 godzinach – wykrywanie bakterii i drożdży (zależnie od aplikacji)
- Wydajność 25, 50, 64 próbki na godzinę.
- Możliwość bezpośredniego liczenia, bez inkubacji. Czułość od 100 komórek dla drożdży i od 1000 komórek dla bakterii
- Wykrywanie mikroorganizmów ze środowisk stresogennych, o obniżonej zawartości składników odżywczych lub zawierających środki konserwujące

Systemy D-Count® oraz BactiFlow ALS® zapewniają

- ● ● optymalizację zarządzania personelem oraz czasem pracy
- ● ● zmniejszenie pracochłonności oraz zmniejszenie zużycia materiałów
- ● ● uzyskanie pewnych wyników po 24 lub 48 godzinach
- ● ● szybkie wykrywanie zakażeń, wczesne podejmowanie działań korekcyjnych
- ● ● szybkie zwolnienie produktu, zwiększenie powierzchni magazynowej
- ● ● skrócenie czasu kwarantanny produktów



Cytometria przepływowa w analizie żywności

Alina Kunicka-Styczyńska

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej



Instrumentalne metody analizy mikrobiologicznej są z powodzeniem wykorzystywane w zakładach wytwarzających żywność. Automatyzacja i komputeryzacja poprzez wprowadzenie nowoczesnych systemów analitycznych zapewnia wiarygodność wyników i komfort pracy oraz poprawia efektywność laboratorium przemysłowego. Na rynku pojawiają się kolejne aparaty, które dają możliwość wykonania coraz większej liczby analiz w tym samym czasie, a metody, które początkowo wydawały się być dedykowane wyłącznie do pracy naukowej, znajdują aplikacje w mikrobiologii przemysłowej. Jedną z najnowszych technik stosowanych w analizie mikrobiologicznej jest cytometria przepływowa. Metoda ta jest uniwersalnym narzędziem przeznaczonym do prowadzenia nieinwazyjnej charakterystyki fizycznej i chemicznej komórek, w tym również komórek mikroorganizmów. Pozwala nie tylko na wykrycie pojedynczych komórek i poszczególnych populacji drobnoustrojów znajdujących się w badanej matrycy, ale również daje możliwość monitorowania przebiegu zachodzących tu procesów biologicznych. Zasada oznaczenia polega na detekcji komórek przechodzących przez strumień światła laserowego. W celu zróżnicowania, dokonuje się znakowania fluorescencyjnego komórek, co daje możliwość równoczesnego wykrycia różnych organizmów bądź też komórek tego samego organizmu w różnych fazach rozwojowych (np. komórek wegetatywnych i przetrwalników). Niekwestionowaną zaletą cytometrów jest szybkość oraz wysoka czułość analizy. Komercyjne cytometry przeznaczone do rutynowych badań przemysłowych pozwalają na ocenę zanieczyszczenia mikrobiologicznego testowanej matrycy nawet po 30 minutach (włączając czas przygotowania próbki) i wykrycie pojedynczych komórek w opakowaniu jednostkowym produktu. Wydajność aparatów jest bardzo duża, na poziomie setek próbek analizowanych w ciągu jednej zmiany.

Systemy cytometrii przepływowej bioMérieux – AES Chemunex przeznaczone do pracy w warunkach przemysłowych (D-Count i BactiFlow ALS), umożliwiają wykrycie drobnoustrojów poprzez znakowanie wyłącznie żywych komórek za pomocą opatentowanego markera Fluorasure®. Te w pełni zautomatyzowane analizatory mikrobiologiczne są już wykorzystywane do określania wskaźników jakości mikrobiologicznej w tak trudnych analitycznie matrycach, jak fermentowane produkty mleczne czy przetwory z dodatkiem wsadów owocowych. Przy niskim poziomie zanieczyszczenia, obecność drożdży zostaje określona w ciągu 24 godzin, a ogólna liczba drobnoustrojów – 48 godzin, w czasie o od 1 do 3 dni krótszym

niż w analizie metodami standardowymi. Cytometry pozwalają na uzyskanie wyników badań jałowości po 24 godzinach dla deserów mlecznych i 24-72 godzinach dla mleka UHT oraz liczby bakterii z rodziny Enterobacteriaceae już po 10 godzinach. Kolejnym przykładem aplikacji w przemyśle spożywczym jest zastosowanie tych systemów do oceny mikrobiologicznej koncentratów, pulp i soków owocowych oraz napojów. Czas podstawowych oznaczeń mikrobiologicznych obejmujących określenie ogólnej liczby drobnoustrojów czy liczby drożdży w koncentratkach owocowych, produktach owocowych i wodzie nie przekracza 30 minut. Wynik analizy uzyskany w tak krótkim czasie pozwala na szybką selekcję surowca lub niemal natychmiastową korektę parametrów procesu technologicznego. Analiza mikrobiologiczna produktów końcowych wymagających wstępnej inkubacji, takich jak soki, nektary, czy mrożona herbata, może być wykonana w czasie od 24 do 48 godzin. Ocena większości produktów wytwarzanych przez producentów soków owocowych i napojów w kierunku obecności drożdży i pleśni oraz określenia ogólnej liczby drobnoustrojów zostaje skrócona o 3-5 dni i nie przekracza 26 godzin.

Wykorzystanie, projektowanych niegdyś głównie do badań w hematologii i onkologii, cytometrów przepływowych na potrzeby przemysłu spożywczego stało się faktem. Znaczące skrócenie czasu analizy mikrobiologicznej przekłada się nie tylko na efekty ekonomiczne zakładu produkcyjnego, ale również zapewnia wzrost bezpieczeństwa wytwarzanej żywności.



BactiFlow, jest półautomatycznym, najlepszym rozwiązaniem dla małych i średnich serii.

Przydatność systemu TEMPO® do monitorowania czystości mikrobiologicznej surowców barwnych

Alina Kunicka-Styczyńska

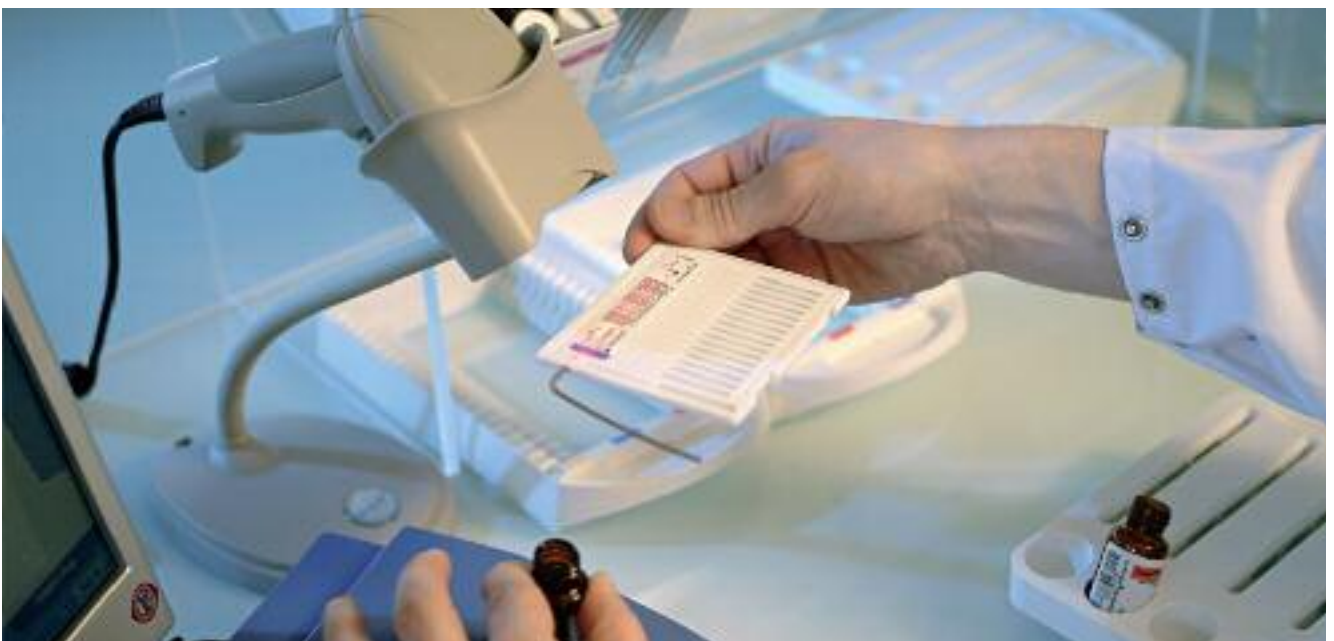
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej, Łódź

Wprowadzenie

Monitorowanie czystości mikrobiologicznej produktów spożywczych i surowców stosowanych do ich wytworzenia jest obecnie rutynowo prowadzone w zakładach przemysłu spożywczego. Zastosowanie nowoczesnych metod analizy znacznie usprawnia kontrolę jakości produkcji i do wprowadzenia nowoczesnych systemów analitycznych nie trzeba już producentów przekonywać. Skomputeryzowane systemy automatyczne nie tylko dają możliwość wykonywania dużej liczby analiz w tym samym czasie, ale pozwalają na równoczesne rejestrowanie wyników i tworzenie obszernych baz danych. System TEMPO® został wprowadzony do Polski w 2006 roku i z powodzeniem jest wykorzystywany do oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego różnorodnych matryc żywności. Okazuje się jednak, że użytkownicy systemu oprócz badań surowców i produktów walidowanych, podejmują próby rozszerzenia jego zastosowań, dostosowując do własnych potrzeb. „Indywidualizacja” zakresu pracy systemu i wprowadzenie nowych protokołów badań są możliwe, a podejmowane

działania zwykle kończą się sukcesem. We właściwym dopracowaniu procedur pomocna jest znajomość zasady działania aparatu. Należy pamiętać, że nawet w przypadku dużej elastyczności metody, nie jest możliwe prowadzenie oznaczeń wszystkich matryc żywności. Każda alternatywna, szybka metoda analizy mikrobiologicznej ma pewne ograniczenia.

W wielu zakładach produkcji żywności jednym z wielu surowców są przyprawy zielarskie czy mączki skrobiowe lub kukurydziane. Oznaczenia czystości mikrobiologicznej tych matryc nie są standardowo walidowane dla większości metod alternatywnych. Ponadto, surowce te stanowią źródła substancji barwnych, związków działających przeciwdrobnoustrojowo i enzymów, które mogą powodować zafalszowanie odczytu. W standardowej metodzie płytkowej, w pożywce o objętości około 15ml koncentracja tych związków znacznie maleje, a duża bezwładność umożliwia regenerację drobnoustrojów w czasie 2-3 dni inkubacji. Powstaje zatem pytanie o wiarygodność metod alternatywnych w oznaczaniu poziomu mikroorganizmów przypraw i mączek skrobiowych.



Krótko o zasadzie działania systemu TEMPO®

W systemie TEMPO® wykorzystano klasyczną metodę rozcieńczeń Listera oznaczania najbardziej prawdopodobnej liczby drobnoustrojów (NPL). Chociaż oznaczenie NPL jest dokładne, to w klasycznej formie metoda ta jest pracochłonna, materiałochłonna i czasochłonna. Z tego też względu, stosowana jest rzadko w praktyce laboratoryjnej. O ile interpretacja odczytanych wyników jest jednoznaczna, gdyż prowadzona jest w oparciu o dane statystyczne zebrane w formie tablic Mc Crady'ego, to trudności może stwarzać prawidłowa ocena wzrostu mikroorganizmów w hodowlach płynnych. Wątpliwości rosną, gdy konieczne jest stosowanie pożywek zawierających barwniki, a poziom zanieczyszczenia badanych matryc jest niski. Podobnie, gdy roztwory matryc o niskich rozcieńczeniach są silnie zabarwione. Należy również podkreślić, że dokładność oznaczenia rośnie wraz z liczbą powtórzeń posiewów z jednego rozcieńczenia. W systemie TEMPO® w pełni zachowano reguły klasycznego oznaczenia NPL, ale dokładność odczytu znacznie zwiększono poprzez prowadzenie hodowli w trzech kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeniach, ale w 16 powtórzeniach każde. System automatycznie napełnia inokulowaną pożywką kartę zawierającą 3 szeregi po 16 cel w trzech różnych objętościach: 2,25µl; 22,5µl i 225µl i ją zamyka. Zmniejszenie objętości hodowli z 10ml do 2,25-225µl znacząco zmniejsza bezwładność układu i przyspiesza odczyt. Detekcja mikroorganizmów jest odmienna niż w klasycznej metodzie NPL. System nie wykrywa zmian turbidymetrycznych hodowli wywołanych wzrostem liczebności populacji jak w metodzie próbkowej, ale detekcja oparta jest na wykryciu specyficznej aktywności metabolicznej komórek w hodowli. Wysoka czułość systemu została osiągnięta poprzez wprowadzenie odczytu fluorescencji celki na skutek reakcji chemicznej specyficznych metabolitów poszukiwanych grup drobnoustrojów ze składnikiem pożywki. Związek wykazujący fluorescencję może być zawarty w pożywce, a jego fluorescencja zanika w wyniku reakcji z metabolitami rosnących mikroorganizmów, bądź też fluorescencja zostaje wzbudzona jako rezultat specyficznych reakcji metabolitów z substancją zawartą w pożywce. Odczyt jest odpowiedzią binarną dla każdej celki (+ lub -), co dla trzech szeregów rozcień-

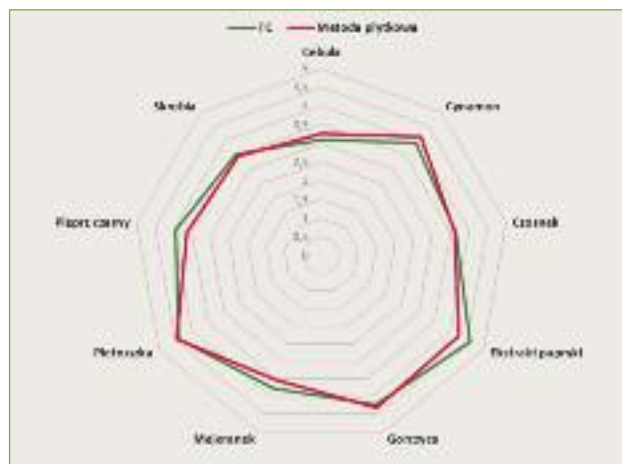


Wykres 1. Porównanie wyników oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych metodą TEMPO® AC i metodą płytkową.

czeń generuje odpowiedź interpretowaną automatycznie według tablic Mc Crady'ego. Aparat automatycznie prowadzi obliczenia statystyczne i podaje interpretację wyniku w postaci liczby komórek w 1g lub 1ml produktu. Przy zastosowaniu takiego systemu odczytu, istnieje również niebezpieczeństwo maskowania fluorescencji hodowli w obecności związków barwnych wprowadzonych wraz z badaną próbką. Problem ten może być wyeliminowany przez rozcieńczenie próbki i prowadzenie oznaczenia przynajmniej począwszy od rozcieńczenia 1/400 lub 1/4000. Rozwiązanie takie jest możliwe jedynie wtedy, gdy zanieczyszczenie próbek w jednostce masy czy objętości przekracza odpowiednio 100 lub 1000 jtk.

Porównanie metody TEMPO® oraz referencyjnej metody płytkowej

W celu odniesienia metody TEMPO® do standardowych metod referencyjnych, wykorzystano rutynowo stosowane w laboratoriach metody płytkowe. W praktyce, jeśli wprowadzana jest metoda alternatywna, to zastępuje ona te właśnie klasyczne oznaczenia. Do badań wybrano osiem przypraw: cebulę w postaci grysu suszonego, cynamon, czosnek w postaci grysu suszonego, ekstrakt papryki czerwonej, gorczycę, majeranek, suszoną natkę pietruszki, pieprz czarny ziarnisty oraz skrobię kukurydzianą. Każdą próbkę badano równocześnie za pomocą systemu TEMPO® oraz standardową metodą płytkową. Próbki zanieczyszczano mieszaniną bakterii *Bacillus subtilis* ATCC® 6633, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048 i drożdży *Candida albicans* ATCC® 10231 do poziomu $10^2 - 10^3$ jtk/g. W standardowej metodzie płytkowej liczbę drobnoustrojów określano według odpowiednich norm PN-EN ISO. W metodzie TEMPO® wykorzystano następujące testy: AC (**A**erobic **C**ount) do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych, TC (**T**otal **C**oliforms), do określenia liczby bakterii z grupy coli wg ISO w temperaturze 30°C, EC (**E**scherichia **C**oli) do określenia liczby *Escherichia coli*, YM (**Y**easts and **M**oulds), do określenia liczby drożdży i pleśni. Badania przeprowadzono w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Przedstawione na wykresach 1-4 wyniki stanowią średnią arytmetyczną 3 powtórzeń.



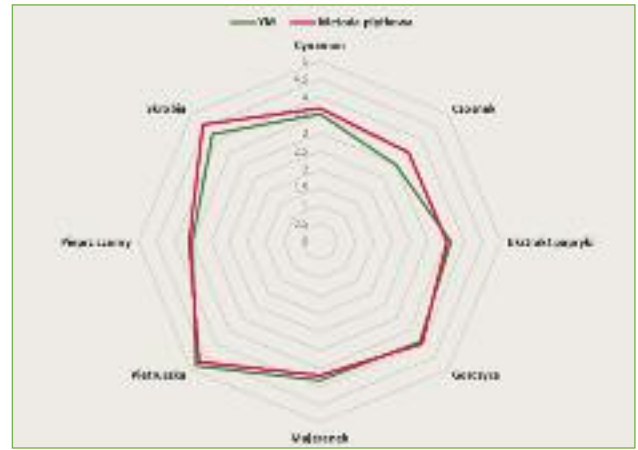
Wykres 2. Porównanie wyników oznaczenia liczby bakterii z grupy coli metodą TEMPO® TC i metodą płytkową.



Wykres 3. Porównanie wyników oznaczenia liczby *Escherichia coli* metodą TEMPO® EC i metodą płytkową.

Dla czterech matryc badanych przypraw (cynamonu, czosnku, gorczycy i pietruszki) wyniki uzyskane metodą alternatywną i referencyjną były podobne (Wykres 1), a różnica oznaczeń nie przekraczała 0,1 jednostki logarytmicznej. Równocześnie, nie stwierdzono zależności prawidłowości oznaczenia w metodzie TEMPO® od intensywności zabarwienia zawiesiny. Wysoką zgodność wyników uzyskano dla oznaczeń liczby bakterii z grupy coli (test TEMPO® TC) i liczby bakterii *Escherichia coli* (test TEMPO® EC). W przypadku tego ostatniego testu, jedynie dla cynamonu odnotowano znaczące odchylenie od metody płytkowej, a różnica wynosiła 0,71 jednostki logarytmicznej (Wykres 2 i 3). Przeprowadzone badania wskazują również na przydatność testu TEMPO® YM do oznaczenia poziomu zanieczyszczenia grzybami. Różnice w odczycie testu YM i metody płytkowej były niewielkie i wynosiły od 0,03 do 0,48 jednostki logarytmicznej (Wykres 4).

Wybrane do badania matryce różnią się stopniem zabarwienia i są klasyfikowane jako mało barwne (grys cebuli, grys czosnku, gorczyca, pieprz czarny ziarnisty i skrobia kukurydziana), średnio barwne (cynamon i natka pietruszki) oraz barwne (ekstrakt czerwonej papryki). Spośród stosowanych testów TEMPO®, trzy testy (TC, EC i YM) wykazują



Wykres 4. Porównanie wyników oznaczenia liczby drożdży i pleśni metodą TEMPO® YM i metodą płytkową.

dobrą zgodność ze standardową metodą płytkową, niezależnie od stopnia zabarwienia roztworu podstawowego matrycy. W testach tych stosowane są pożywki selektywne, umożliwiające rozwój specyficznych grup drobnoustrojów, podczas gdy pozostałe mikroorganizmy zanieczyszczające nie wykazują aktywności metabolicznej. Detekcja w systemie TEMPO® jest wynikiem obecności specyficznych enzymów wytwarzanych przez rosnące drobnoustroje, a dla konkretnego testu jest to zwykle jeden enzym; i tak dla poszczególnych testów: TC - β -galaktozydaza, EC - β -glukuronidaza i YM - nitroreduktaza. Jak wynika zatem z powyższych badań, testy te są „mniej wrażliwe” na interferencje z powodu swojej wysokiej specyficzności. Ideą testu AC jest określenie liczby wszystkich drobnoustrojów tlenowych znajdujących w próbce, co wymaga znacznie mniejszej specyficzności. Detekcja mikroorganizmów w teście AC powiązana jest z obecnością kilku enzymów takich jak fosfataza, glukozydaza czy peptydaza, działających optymalnie przy różnych wartościach pH. Wprowadzone z próbką barwniki i inne substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej mogą zarówno hamować wzrost pewnych grup drobnoustrojów, jak również zmieniać ich aktywność enzymatyczną. W przypadkach niektórych matryc skutkuje to niedoszacowaniem liczby drobnoustrojów bądź maskowaniem fluorescencji przy niskim poziomie enzymów.

Podsumowanie

System TEMPO® stanowi wiarygodną i elastyczną platformę w analizie mikrobiologicznej żywności, oferując testy umożliwiające monitoring produktów w pełnym zakresie normatywnym. Możliwe jest rozszerzenie analiz na produkty i surowce, których analizy nie zostały zwalidowane. Warunkiem koniecznym jest jednak sprawdzenie kompatybilności testów z metodami referencyjnymi dla konkretnych asortymentów. Przy wyborze matryc należy uwzględnić dopuszczalny normatywny poziom zanieczyszczenia. Metody alternatywne nie są zalecane do badania próbek o wysokim stopniu zabarwienia i wysokiej czystości mikrobiologicznej. Przy poziomie zanieczyszczenia rzędu 10^2 i powyżej, rozcieńczenie próbki przed analizą zwykle znacznie zmniejsza ryzyko interferencji odczytu.



bioMérieux wprowadza nowy, szybki test

TEMPO® BC

do wykrywania bakterii
Bacillus cereus
w żywności i próbach środowiskowych

Certyfikat z walidacji AOAC – RI
dostępny w lipcu 2014
Walidacja według ISO 16140 – w trakcie badań
(planowane zakończenie koniec 2014)



TEMPO® zapewnia

- • • optymalizację zarządzania personelem oraz czasem pracy
- • • zmniejszenie pracochłonności oraz zmniejszenie zużycia materiałów
- • • uzyskanie dokładnych wyników, bez konieczności potwierdzenia, w ciągu 24 godzin
- • • efektywne śledzenie próbki oraz zwiększenie wydajności laboratorium

- TEMPO® BC pozwala na liczenie bakterii *Bacillus cereus* w czasie 24 godzin
- **Wyniki w ciągu 24 godzin bez konieczności potwierdzenia**
- Wykrywanie komórek wegetatywnych oraz przetrwalników
- szybki, prosty i pewny odczyt wyników próbek o niskim oraz wysokim stopniu zanieczyszczenia
- Dostępne trzy progi czułości zależnie od wymagań klienta: < 10, < 50, < 100 jtk/g
- Szeroki zakres badanych matryc: produkty zbożowe, warzywa, żywność dla niemowląt, sery i desery mleczne, produkty cukiernicze, żywność gotowa do spożycia, mleko i jaja w proszku, ryby, mięso, karma dla zwierząt domowych, próbki środowiskowe
- Bardzo dobra zgodność wyników z ISO 7932 (badania objęły 595 próbek naturalnych oraz sztucznie kontaminowanych)

Automatyzacja pracy laboratorium – nowoczesne rozwiązania

Współczesne laboratoria mikrobiologiczne w coraz większym stopniu dążą do skracania czasu trwania procesów jednostkowych, redukcji czynności manualnych w celu poprawienia efektywności oraz zwiększenia przepustowości laboratorium. Stąd duże zainteresowanie automatyzacją pracy oraz zwiększaniem wydajności. bioMérieux jako wieloletni partner chcąc sprostać rosnącym oczekiwaniom klientów wprowadziła na rynek aparaty służące do automatycznego przygotowywania próbek. Firma w swojej ofercie posiada trzy systemy: Dilumat Start, Expert oraz Evo. Różnią się one wydajnością oraz parametrami pracy.

Aparaty spełniają wymogi standardów ISO 7218 oraz ISO 6887-1 określającymi maksymalny błąd ważenia jako 1 % oraz maksymalny błąd rozcieńczania jako 5%. Posiadają nowoczesną, kompaktową budowę, dodatkowo wyposażone zostały w tryb pracy „czuwanie”, włącznik główny umiejscowiony w przednim panelu aparatu, jak również kolorowe diody LED informujące o statusie pracy. Elementy te zdecydowanie ułatwiają pracę podczas przygotowywania próbki.

Główną zaletą urządzeń jest nowoczesny panel dotykowy, który może być przez użytkownika ustawiony w dowolnej pozycji oraz odległości od aparatu. Kolejną zaletą to niezwykle prosty interfejs oraz przycisk pomocy, który po aktywacji wyświetla informacje dla danej funkcji aparatu, dzięki czemu możliwe jest przygotowanie próbki bez wcześniejszej lektury książki użytkownika. Oprócz podstawowych funkcji takich jak: rozcieńczanie z programowanymi współczynnikami od 2 do 1000, rozcieńczanie od 5g do 2000g (Dilumat Start), od 3g do 3000g (Dilumat Expert) lub od 8g do 7000g (Dilumat Evo), dozowanie, możliwość rozbudowy o dodatkowe pompy (dodatkowa pompa w Dilumacie Start, dodatkowe cztery pompy w Dilumat Expert i Evo), aparaty posiadają funkcję „Auto start”, dzięki czemu przygotowanie próbki zostało skrócone do minimum. W tym przypadku przygotowanie próbki sprowadza się do jej odważenia, natomiast aparat po wcześniejszej aktywacji funkcji „Autotary” uruchamia proces rozcieńczania (funkcja dostępna w dilumat Expert oraz Evo).

Maksymalizacja automatyzacji rozcieńczania pozwala zwiększyć przepustowość zwłaszcza w laboratoriach wykonujących dużą liczbę badań. Ponadto standardowo urządzenia (poza Dilumatem Start) dają możliwość wyboru pracy pomp: tryb wolny, średni oraz szybki co ma znaczenie w przypadku rozcieńczania próbek pylistych bądź rozpryskujących. Aparaty są niezwykle szybkie, rozcieńczanie standardowej próbki w Dilumacie Start trwa

16 sekund, w Dilumacie Expert i Evo 10 sekund, dodatkowo dwa ostatnie dilumaty pozwalają na przygotowanie rozcieńczeń 1:10 lub 1:4, próbek o masie 375 g. W tym przypadku aparaty wyposażone zostały w dodatkowe statywy na średnie oraz duże torebki jak również dodatkowy czujnik dla większego zakresu ważenia.

Warto wspomnieć również o możliwości rejestrowania przez aparaty ich pracy, identyfikacji próbki, rozcieńczalnika czy użytkownika. Jest to możliwe nie tylko dzięki programowaniu ale również przez możliwość podłączenia czytników kodów, kamery, systemu LIMS, drukarki. Ponadto bioMérieux wyposażyło dilumaty w nowatorskie rozwiązanie, wbudowany czytnik kodu RFID, który pozwala niezwykle szybko zidentyfikować próbkę oraz rozcieńczalnik, zwiększając wydajność oraz przepustowość laboratorium.

Dilumaty Start, Expert oraz Evo charakteryzują się wodoodporną, odporną na zarysowania obudową, kompaktową budową, wyposażone zostały w ruchome ramię dozujące, umożliwiające wykonanie sześciu różnych operacji rozcieńczania bądź dozowania. Zapewniają pełne programowanie, z uwzględnieniem różnych użytkowników, rozcieńczalników, współczynników rozcieńczeń jak również zakresów wagowych badanych próbek. Szeroki zakres wagowy rozcieńczeń, których dokładność jest zgodna z wymogami ISO, pozwala na zastosowanie dilumatów w badaniach żywności, kosmetyków lub farmaceutyków. Aparaty Start, Expert oraz Evo to najnowocześniejsze rozwiązania w automatyzacji laboratorium, które spełniają oczekiwania najbardziej wymagających klientów.



Labguard – system monitoringu parametrów fizycznych

System Labguard wykorzystywany do monitorowania parametrów fizycznych został po raz pierwszy zastosowany w roku 1995. Od tego czasu system jest rozwijany i udoskonalany, a obecna wersja (Labguard 2) jest już piątą generacją. Labguard gwarantuje Państwu zachowanie optymalnych warunków analiz w laboratorium ale może być również wykorzystywany do monitorowania linii produkcyjnych, magazynów czy transportu.

System Labguard jest kompletnym rozwiązaniem zapewniającym ciągły monitoring (24 godziny na dobę 7 dni w tygodniu) parametrów fizycznych, w czasie rzeczywistym. Dzięki systemowi mogą Państwo bez problemów spełnić wymagania zawarte w różnych normach (EN ISO 17025 / CN ISO 15189 / EN ISO 7218 / EN 12830 / EN ISO 22716BPF) czy rekomendacji FDA – CFR 21 część 11.

Może być on wykorzystany do monitorowania i kontroli temperatury oraz innych parametrów fizycznych takich jak: wilgotność, poziom CO₂, ilość cząstek, różnicę ciśnień i wiele innych dzięki możliwości podłączenia dowolnego czujnika z wyjściem 4-20mA (0-5V). Możliwe jest monitorowanie od 1 do ponad 1500 różnych punktów. Labguard to nie tylko czujniki oraz oprzyrządowanie ale również kompletne oprogramowanie, pełna dokumentacja oraz wszechstronny serwis.

System działa w wykorzystaniem technologii bezprzewodowej. Każdy czujnik podłączony jest do nadajnika, który przechowuje pomiary w pamięci wewnętrznej, a następnie przekazuje je drogą bezprzewodową do odbiornika. Następnie odbiornik podłączony bezpośrednio do komputera albo do sieci komputerowej (Ethernet) przekazuje dane do oprogramowania. Dzięki wykorzystaniu najnowszych rozwiązań technologicznych system Labguard może być wykorzystany nie tylko w jednym laboratorium (firmie) ale również umożliwia instalacje wielostrefowe. W przypadku instalacji wielostrefowych odbiornik przekazuje dane do serwera z wykorzystaniem protokołu IP/TCP, a następnie każdy użytkownik posiadający komputer podłączony do Internetu ma dostęp do wszelkich danych z wykorzystaniem adresu IP serwera. Dostęp do danych jest zabezpieczony, a każdemu użytkownikowi można nadać odpowiednie uprawnienia. Wszystkie logowania do systemu i wszelkie zmiany są monitorowane.

Standardowe czujniki temperatury wchodzące w skład systemu Labguard zostały zaprojektowane specjalnie z myślą o wykorzystaniu w laboratorium. Rozdzielczość pomiarowa takiego czujnika temperatury to 0,0625°C, a jego

dokładność w całym zakresie pracy (od -80°C do +80°C) wynosi maksymalnie +/- 0,2°C.

Każdy nadajnik posiada własne zasilanie (bateria) wykorzystywane w przypadku pracy rutynowej lub jako zasilanie awaryjne. Dodatkowo nadajniki mają pamięć obejmującą 4500 pomiarów dzięki czemu praktycznie nie ma możliwości utraty danych spowodowanych brakiem zasilania lub awarią któregoś z elementów systemu.

Najpopularniejsze elementy systemu Labguard

Nadajnik z cyfrowym czujnikiem temperatury



Dostarczane z 1 lub 2 czujnikami temperatury, uchwytem umożliwiającym przytwierdzenie do ściany/urządzenia oraz baterią litową 3,6 V. Zakres pomiarowy -80°C to +80°C.

Odbiornik IP



Odbiornik sygnałów radiowych systemu Labguard dostarczony razem z kablem sieciowym

Aksesoria – płaski kabel



Nadajniki umieszczone są na zewnątrz urządzenia, a czujnik umieszczone wewnątrz. W przypadku kiedy urządzenie nie jest wyposażone w tzw. wejście techniczne, płaski kabel może zostać wykorzystany do podłączenia czujnika z nadajnikiem przez drzwi bez uszkodzenia uszczelki.

Modem GPRS



Modem umożliwiający wysyłanie alarmów z wykorzystaniem SMS, fax czy poczty głosowej. Dostarczony z anteną, kablem transmisji głosu oraz kablem USB.

TomKey



TomKey jest niezależnym czujnikiem temperatury, wykorzystywanym do monitorowania warunków transportu, pracującym w zakresie temperatur -30°C do $+80^{\circ}\text{C}$. Zawiera wyświetlacz pokazujący wartości takie jak: ostatni pomiar, wartość górnego czy dolnego alarmu i inne. Każdy czujnik ma pamięć na 8000 lub 16000 pomiarów i może być podłączony bezpośrednio do komputera przez port USB

TomProbe



TomProbe jest niezależnym czujnikiem temperatury wykorzystywanym do mierzenia temperatury w zakresie od -20°C do $+125^{\circ}\text{C}$ oraz określenia wilgotności względnej od 0% do 100%. Może być wykorzystywane zarówno w przypadku monitorowania warunków transportu jak również do kontroli pracy autoklawu.

Serwis oraz świadectwa wzorcowania:

Na życzenie klienta firma bioMérieux dostarcza świadectwa wzorcowania. Wzorcowanie odbywa się w akredytowanych przez PCA laboratoriach wzorcujących.

Biorąc pod uwagę wieloletnie doświadczenie bioMérieux oraz wymagania zawarte w dokumencie EA-04/10 wydanym przez Polskie Centrum Akredytacji stanowiącym uzupełnieniu do normy EN ISO/IEC 17025, serwis techniczny rekomenduje wykonanie raz do roku sprawdzenia czujników.

Standardy i zgodności:

Technologia bezprzewodowa spełnia Europejskie (868 Mhz) standardy telekomunikacyjne oraz rekomendacje EN300-220. Jest również zgodny z następującymi dyrektywami:

89/336/EC – dotycząca zgodności elektromagnetycznej

RSTTE 99/5/EC – dotycząca testów radiowych

73/23/EEC – dotycząca badań bezpieczeństwa elektrycznego



Labguard® 2

PREVI ColorGram – automatyczne barwienie preparatów metodą Grama

Preparat barwiony metodą Grama pozostaje jedną z podstawowych technik stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej, pomimo ciągłych zmian zmierzających do jej przyspieszenia. Niesie on ze sobą wiele cennych informacji, które mogą ukierunkować dalszą diagnostykę lub postawienie wstępnej diagnozy. Wydaje się nieoceniony w przypadku badań płynu mózgowo-rdzeniowego, dodatkich posiewów krwi, materiałów pobranych z ran i wielu innych. Niestety wielu mikrobiologów uważa preparat za uciążliwy w wykonaniu ze względu na wiele czynności manualnych, konieczność dokładnego odmierzenia czasu, powstające niebezpieczne, brudzące odpady. Nowoczesnym rozwiązaniem problemów związanych z procesem barwienia metodą Grama jest nowa wersja aparatu



PREVI Color v.2

Aparat ten umożliwia w pełni automatyczne wybarwienie preparatów od utrwalenia do wysuszenia. Nowoczesna linia, wyposażenie w graficzne oprogramowanie z ekranem dotykowym i czytnik kodów kreskowych dla kontroli odczynników i preparatów, to nowe cechy systemu. Zastosowana specjalna metoda rozpylania barwników poprzez dysze, gwarantuje standaryzację procesu barwienia, optymalizuje zużycie odczynników i ogranicza ilość odpadów. Dzięki wprowadzonym w nowej wersji PREVI Color czujnikom, użytkownik ma możliwość automatycznego nadzorowania poziomu zarówno odczynników, jak i odpadów.

Proces barwienia odbywa się w układzie zamkniętym, a odpady są usuwane do zintegrowanego z aparatem po-

jemnika. Zapewnia to czystość w laboratorium i pełne bezpieczeństwo operatora.

Niewielkie wymiary aparatu pozwalają na ustawienie go w dowolnym miejscu laboratorium. Nie jest to również uzależnione od dostępu do wody, zlewu itp.

Z uwagi na dużą elastyczność systemu PREVI Color Gram może stać się elementem wyposażenia każdego laboratorium, niezależnie od jego wielkości i specyfiki. Dwie wielkości rotora na preparaty umożliwiają jednoczesne barwienie 1-12 lub 1-30 szkiełek. W zależności od rodzaju lub grubości preparatu użytkownik wybiera jeden z dziesięciu różnych programów lub w razie konieczności wprowadza własny.

Integralną część systemu PREVI Color Gram stanowią gotowe do bezpośredniego użytku odczynniki w specjalnych butelkach dopasowanych do aparatu. W ofercie znajduje się kilka wersji odczynnika kontrastowego, tak by laboratorium mogło wybrać najlepszy z punktu widzenia swoich potrzeb i przyzwyczajzeń.

Aby zagęścić badany materiał przed wykonaniem preparatu barwionego metodą Grama rotor do barwienia można zamienić na specjalny rotor do cytowania. W ten sposób jeden aparat w zależności od potrzeb może stać się cytowórką lub systemem do automatycznego barwienia.

Podsumowując PREVI Color Gram to system, który w każdym laboratorium pomoże uzyskać preparat barwiony metodą Grama w sposób wystandaryzowany, bezpieczny, ograniczając manualną pracę i możliwość popełnienia błędów.



The logo for PREVI, featuring a blue arc above the word "PREVI" in a bold, blue, sans-serif font, with a trademark symbol (TM) to the upper right.

— Color Gram

do automatycznego barwienia
preparatów metodą Grama



*TECHNOLOGIA
KTÓREJ MOŻESZ ZAUFAĆ*