

## Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Rozdělení screeningových metod .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Metody pro zjišťování počtu mikrobiálních buněk.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Kultivační metody .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.1 Otiskové metody.....</b>	<b>14</b>
3.1.1.1 Komerčně dodávané otiskové plotny .....	15
<b>3.1.2 Stěrové metody .....</b>	<b>16</b>
3.1.2.1 Komerčně dodávané stěry a screeningové testy .....	16
<b>3.1.3 Metoda membránové filtrace.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.4 Metoda MPN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Nefelometrické stanovení počtu mikroorganismů .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Test na přítomnost či nepřítomnost bakterií.....</b>	<b>22</b>
4.1 P/A metoda.....	22
4.2 BART™ test.....	22
<b>5. Luminiscenční metoda .....</b>	<b>24</b>
<b>6. Miniaturizace biochemických testů .....</b>	<b>25</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>27</b>
<b>8. Seznam použité literatury .....</b>	<b>30</b>

# 1. Úvod

V potravinářských provozech je sledování hygieny důležité, protože pracovní plocha a nástroje mohou být kontaminovány a ke kontaminaci rukou může dojít například od znečištěných vodovodních kohoutků a klik dveří. Riziko nehygiečnosti provozu je nutné průběžně snižovat, ačkoli nulového rizika nelze dosáhnout nikdy.<sup>1)</sup>

Při výrobě potravin, jejich úpravě, přepravě a ostatní manipulaci jsou potřeba snadné a jednoduché metody pro stanovení hygienické úrovně povrchů a rovněž výrobků samotných. Pro stanovení úrovně hygieny se používají pro různé povrchy a různá místa různé metody. Je třeba, aby testy byly rychlé a relativně levné. Díky nově vyvinutým metodám je nyní možné získat výsledky vyšetření povrchových a hygienických vzorků již během několika minut. To je během výroby potravin velmi důležité, protože sebemenší bakteriální kontaminace může zhoršit kvalitu finálního výrobku.<sup>1)</sup> Tyto metody jsou označovány jako screeningové (rychlé) metody.

## 2. Rozdělení screeningových metod

Screeningové metody stanovení jsou to tzv. rychlé metody a jejich doba trvání je většinou do 24 hodin (záleží na stanovovaných MO). Jsou vhodné pro orientační rozbor většího množství vzorků. Pozitivní nález musí být potvrzen normovanou metodou pro daný mikroorganismus. Pro tyto metody je charakteristické - specifita, citlivost, rychlost a cena.<sup>2)</sup> Tyto metody dělíme na přímé, nepřímé a vyvíjené nepřímé metody.

**Přímé metody** – informují přímo o počtu bakterií a slouží k monitorování mikrobiální kontaminace, umožňují vyhodnocovat trendy.<sup>1)</sup>

### ❖ Metody pro zjišťování počtu mikrobiálních buněk

#### ▪ Kultivační metody

- ◆ **Otiskové metody** - Petrifilm, Dip Slides, Hygicult, Lopatkový test
- ◆ **Stěrové metody** - Q-Swab<sup>TM</sup>, PathChek Hygiene Pathogen, InSite<sup>TM</sup>Listeria
- ◆ **Metoda membránová filtrace**
- ◆ **MPN**

#### ▪ Nefelometrické stanovení počtu mikroorganismů

### ❖ Test na přítomnost či nepřítomnost bakterií

- **P/A metoda**
- **BART<sup>TM</sup> test**

**Nepřímé metody** – neinformují přímo o počtu bakterií, ale měří některé vlastnosti vázané na mikroby, monitorování nečistot. Jsou vhodné pro zpracování a monitoring podnikových standardů hygieny.<sup>1)</sup>

### ❖ Luminiscenční metoda

### ❖ Miniaturizace biochemických testů

## Vyvíjené nepřímé metody

Mezi tyto metody například patří: turbidimetrie, kalometrie, fluorometrie, radiometrie, mikrokalorimetrie, katalázové testy, endotoxinový test (LAL) a biosenzory.<sup>1)</sup>

Popis některých metod:

- **Turbidimetrie:** Bakterie v průběhu množení tvoří v tekutém vzorku zákal. Metoda využívá měření změn intenzity zákalu média v závislosti na čase. Intenzita zákalu je závislá na počáteční koncentraci mikroorganismů. Využívá se k měření celkového počtu mikroorganismů (aerobních i anaerobních).<sup>7)</sup>

- **Radiometrie:** U těchto metod se zjišťuje tvorba CO<sub>2</sub> ze značeného uhlíkatého substrátu. V potravinářství se nejčastěji používají tyto metody pro rozbor zmražených potravin a potravinářských surovin. Tato metoda byla automatizována (např. přístroj Bactec, vyráběný firmou Johnston Laboratories, USA). Výsledek se získá za 4 – 6 hodin.<sup>3)</sup>

- **Endotoxinový test = Limulus test:** Použití lyzátu amoebocytů krabu *Limulus polyphemus*, který je připravován americkou firmou Difco (Detroit), je založen na tom, že endotoxin přítomný ve stěně gramnegativních střevních bakterií koaguluje tento lyzát za tvorby gelu nebo vloček. Pozitivní reakci po 1 hodině inkubace při 37°C dá  $5 \times 10^2$  bakteriálních buněk/ml. Metoda je tedy velmi rychlá a umožňuje zjišťování koliformních bakterií v syrovém mléce, mletém mase, uzeninách apod.<sup>2), 3)</sup>

### **3. Metody pro zjišťování počtu mikrobiálních buněk**

V potravinářství je stanovení počtu mikrobů velmi důležité, neboť nás informuje o kvalitě surovin i hotových výrobků a o jejich údržnosti. Sledováním počtu mikroorganismů, případně i jejich druhů, se můžeme také přesvědčit o vhodnosti technologických postupů v potravinářském průmyslu, o bezpečnosti sterilačních zákroků a konečně o sanitačních a hygienických podmínkách na daném úseku výroby nebo distribuce. Metody zjišťující počet buněk jsou nejpřesnější a nejcitlivější.<sup>3)</sup>

#### **3.1 Kultivační metody**

Kultivační stanovení počtu mikrobů spočívá na principu přenášení mikroorganismů na vhodnou půdu, kde jsou schopny rozmnožování. Zjišťuje se tedy počet živých buněk, neboť kritériem životnosti mikrobiální buňky je schopnost autoreprodukce, tedy schopnost syntézy buněčného materiálu a schopnost buněčného dělení. Těchto metod lze použít pro prakticky libovolně hustou suspenzi mikroorganismů a ve směsích je často možno rozlišit jednotlivé skupiny nebo rody. Nevýhodou je delší doba potřebná k získání výsledků (24 hodin). U směsí různých mikroorganismů dostáváme většinou poněkud nižší výsledky, než odpovídá skutečnosti, neboť nemůžeme zaručit vhodné kultivační podmínky všem přítomným mikroorganismům.<sup>3)</sup>

##### **3.1.1 Otiskové metody**

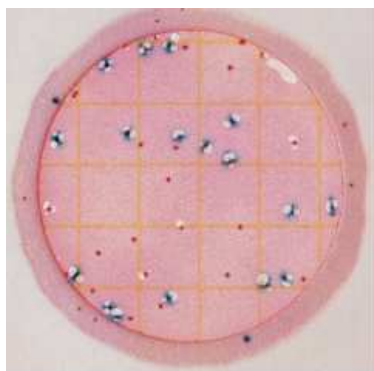
Účelem těchto metod není přesně zjistit celkový počet bakterií kontaminujících vyšetřovaný povrch, ale informovat o jeho hygienickém stavu.<sup>1)</sup>

Interpretace otiskových ploten bývá obtížnější, jestliže zde naroste více než 200 kolonií. Výsledky lze udávat jako počet CFU připadající na celou plotnu anebo určitou část její plochy (cm<sup>2</sup>).<sup>1)</sup> Kolonie se tvoří z jednotlivých buněk, jejich párů, krátkých řetízků či shluků buněk, proto se hovoří o jednotce pro vyjádření počtu bakterií jako o „kolonii tvořící jednotku“ KTJ (x počet bakteriálních buněk), v angličtině „colony forming unit“ CFU.<sup>4)</sup> Jako pomůcky pro interpretaci výsledků je u komerčních otiskových metod k dispozici modelová tabulka. Tato modelová tabulka dodávána v každém balení umožňuje odhad hygienické úrovně sledovaného povrchu na základě hustoty kolonií narostlých na kultivačním médiu.<sup>1)</sup>

### 3.1.1.1 Komerčně dodávané otiskové plotny

- **Petrifilm**

Petrifilmy jsou destičky pro přesnou kontrolu mikrobiologické kvality potravin nebo prostředí potravinářských provozů. Jedná se o médium přímo připravené k inokulaci vzorků. Destičky se skládají ze dvou vrstev filmů, které obsahují živná média, gel rozpustný ve studené vodě a speciální indikátor, který zvýrazní narostlé kolonie mikroorganismů na destičce. Natištěná mřížka usnadní počítání kolonií.<sup>5)</sup> Film je pružný a proto nemusí být zkoumaný povrch rovný. Využití pro stanovení celkového počtu bakterií, počtu koliformních bakterií, *E. coli*, kvasinek a plísní.<sup>1)</sup>



**Obr. 1:**

**3M<sup>TM</sup>Petrifilm<sup>TM</sup>E. coli/Coliform Count Plate<sup>6)</sup>**

- dva testy v jednom: stanovení *E. coli* a koliformních bakterií
- obsahuje  $\beta$ -glukuronidázový indikátor pro detekci *E. coli*
- bez použití MPN metody
- *E. coli*: výsledky za 24 hodin pro maso, drůbež a mořské plody nebo 48 hodin v případě všech ostatních potravin

- **Lopátkový testr HACH, Hygicult, Biotest HYCON Dip Slides**

Je to plastová destička oboustranně pokrytá kultivačním médiem a umístěná ve sterilní nádobce. Je určena k rychlému monitorování úrovně mikrobiální kontaminace v potravinářských provozech a monitorování hygienické nezávadnosti kapalin. Výhodou je snadné použití mimo laboratoř. Nevýhodou je, že sortiment destiček je omezen pouze na indikátorové mikroorganismy.<sup>7)</sup>

Vzorek lze na nosič (destičku) očkovat otiskovou metodou nebo odběrovým tampónem. Po odběru vzorku se nosič uzavře zpět do krycí nádoby, ve které může být vzorek bezpečněji transportován v nezměněném stavu. V závislosti na typech médií na nosiči lze stanovovat celkový počet bakterií, počet enterobakterií, koliformních bakterií, pseudomonád, kvasinek a plísní.<sup>1)</sup>






Citlivost reakce je 100 MO/1 ml. Testery se kultivují ve tmě buď při laboratorní teplotě či při 37°C a po 24h, 48h až 5-7 dnech (dle stanovení) se plocha s narostlými koloniemi porovnává s ilustračními tabulkami udávajícími titer ( $10^x$  počtu mikroorganismů).<sup>4)</sup>



### Obr. 2: Hygicult® CF<sup>8)</sup>

Je to kultivační destička typu diplslide pro detekci koliformních bakterií u různých typů pevných i kapalných materiálů. Destička je z obou stran pokryta modifikovaným agarem VRB, který podporuje růst koliformních bakterií. Růst gram-pozitivních organismů je inhibován. Koliformní bakterie rostou na agaru jako zářivé červené kolonie.<sup>9)</sup>

**Obr. 3: Hygicult E/Hygicult CF<sup>8)</sup>** – ilustrační tabulka (Hygicult E - pro detekci bakterií rodu *Enterobacteriaceae*)

Smočení/tampón CFU/ml	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
Kontakt					
CFU/strana	10	50	450	800	>1000
CFU/cm <sup>2</sup>	1	5	45	80	>100

### 3.1.2 Stěrové metody

Stěry se normálně kultivují na plotnách a výsledky jsou udávány jako CFU.cm<sup>-2</sup> podle běžných pravidel počítání kolonií. Pomocí odběrového tampónu zvlhčeného sterilním fyziologickým roztokem se stírá 10 cm<sup>2</sup>. K vymezení plochy se používá sterilní šablona. Setření plochy je potřeba provést dvakrát, přičemž druhé stírání se provádí v kolmém směru na předchozí. Při odebírání stěru je třeba se dotknout každého místa stejným způsobem. Po odběru stěru se odběrový tampón vloží do sterilní zkumavky, která obsahuje 10 ml sterilního fyziologického roztoku. Zachycené mikroby se převedou do fyziologického roztoku vytřepáním tampónu.<sup>1)</sup>

#### 3.1.2.1 Komerčně dodávané stěry a screeningové testy

- **Q-Swab<sup>TM</sup>**

Q-Swab je přípravek připravený k použití při odběru a transportu stěrových vzorků v potravinářském a nápojovém průmyslu. Přináší úspory času a nákladů odstraněním nutnosti vyrábět stěrové tampóny a vytřepávací roztoky, sterilizovat zkumavky a pipety atd. Příslušný roztok (1 ml) je obsažen v ampuli s patentovaným lámacím ventilem

(SnapValve™). Po zlomení ventilu je roztok uvolněn do tuby se stěrovým tampónem, kde zneutralizuje zbytky sanitačních činidel a umožní efektivní uvolnění mikroorganismů. Vzorek je tak připraven k přepravě, nanesení na agar nebo nalití přímo na dehydrované médium. Je to sterilní přípravek „vše v jednom“. V jednom balení je 250 stěrů.<sup>10)</sup>



Přípravky Q-Swab jsou dodávány, společností SKA-TEC, v pěti variantách. Příklad QS1400 – Amies Medium: lepší transport média, obsahujícího uhlí k prodloužení životnosti patogenních organismů, obzvláště *Neisseria gonorrhoeae*. Slámově zbarvený roztok.<sup>11)</sup>

**Obr. 4: Q-Swab™<sup>10)</sup>**

- **PathChek Hygiene Pathogen**

System na detekci potravinových patogenů na povrchu výrobních zařízení a v prostředí potravinářských výrob. Přítomnost testovaného mikroorganismu je signalizována změnou zbarvení roztoku.<sup>12)</sup>

Detekční systém se skládá ze dvou prvků:

- zvlhčený stěrový tampón, výhodou je neutralizační efekt na běžně používané čisticí prostředky a zlepšení sběru bakterií ze suchého povrchu
- vysoce specifické a selektivní detekční médium, které poskytuje jednoznačné výsledky v podobě změny barvy média.<sup>12)</sup>

Společnost SKA-TEC nabízí 3 varianty detekčního média:

- Listeria, cena 58,- Kč/test
- Koliformy, cena 52,- Kč/test
- Salmonella, cena 70,- Kč/test<sup>12)</sup>

**Obr. 5: PathChek Hygiene Pathogen<sup>12)</sup>**



Detekční systém vyhovuje požadavkům ISO 18395:2004 (Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metody specifikují techniky vzorkování z povrchů pomocí kontaktních ploten a stěrů).<sup>12)</sup>

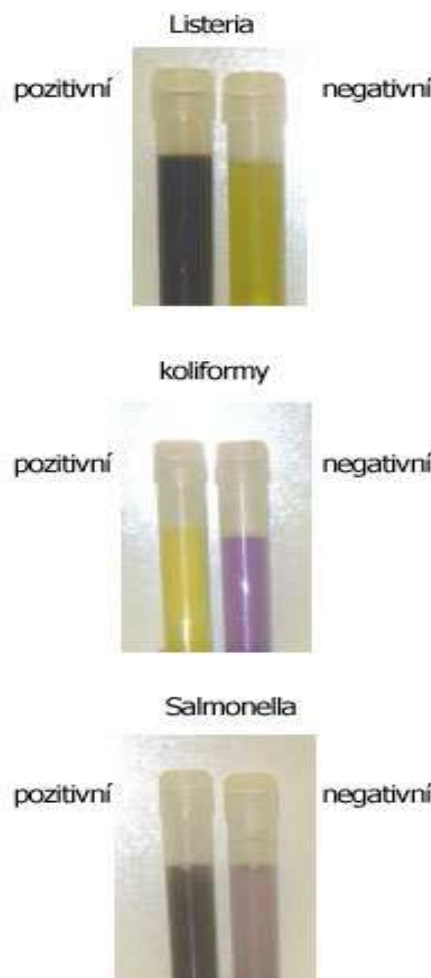


Použití Path-Chek Hygiene Pathogen Systém přináší rychlou, jednoduchou a levnou metodu monitoringu patogenů a hygieny, a měl by tvořit základ systému GMP a nedílnou součást kvalitního HACCP systému.<sup>12)</sup>

### Postup:

- Stěr testovaného povrchu na ploše alespoň 10x10 cm.
- Vložení stěru do specifického chromogenního média.
- Inkubace při 37°C (*Salmonella* a koliformy 18-24 hodin, *Listeria* 30-48 hodin).
- Růst cílových bakterií je indikován změnou barvy média. Vyšší kontaminace znamená rychlejší změnu.
- V případě pozitivního nálezu je možné použít takto pomnožený vzorek na konfirmaci a podrobný mikrobiologický rozbor.<sup>12)</sup>

Obr. 6: Detekce patogenních bakterií<sup>12)</sup>



### Výhody:

- Nejdůležitější skupiny patogenů v jednom testovacím systému.
- Rychlá metoda - nevyžaduje předchozí pomnožení vzorku.
- K dispozici jsou komplexní data studií citlivosti (<1KTJ na 10cm<sup>2</sup>) a specifcity.
- Všechny tři testy spolehlivě detekují jednotkovou kontaminaci (< 5 KTJ).
- Na provedení rozboru není potřeba žádné vybavení mikrobiologické laboratoře.
- Stěry a detekční média jsou k dispozici samostatně, což umožňuje flexibilní použití.<sup>12)</sup>

- **InSite™ Listeria**

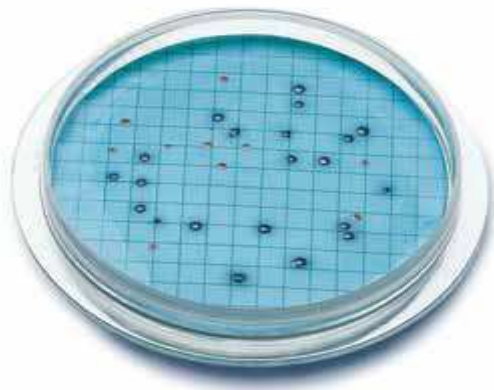
Screeningový test na detekci *Listeria* pro použití v provozním prostředí a na kontaktních plochách určených pro zpracování potravin. Test obsahuje kombinaci antibiotik (zamezují růstu většiny MO kromě listerií), růstových stimulátorů (pro podporu obnovy subletální poškozených buněk) a chromogenních látek (mění barvu ze žluté na černou v přítomnosti  $\beta$ -glukosidázy produkované listeriem). Černá až hnědá barva po 30 – 48 hodinách inkubace při 37°C indikuje předpokládanou přítomnost bakterií rodu *Listeria*.<sup>13), 14)</sup>

### 3.1.3 Metoda membránové filtrace

Mezi nejpresnější metody detekce MO patří membránová filtrace, ale lze ji použít pouze u naprosto čistých vzorků. Princip této metody spočívá ve filtraci vzorku sterilním membránovým filtrem, schopným zachytit mikrobiální buňky. Následné přenesení tohoto filtru na desku živné půdy (obsahující speciální reagent) a inkubaci za optimální teploty pro vytvoření jednotlivých kolonií. Přítomnost sledovaných mikroorganismů se projeví nárůstem barevných kolonií velikosti špendlíkové hlavičky. Počet kolonií na misce po uplynutí předepsané inkubační doby odpovídá počtu MO přítomných ve vzorku. Této metody se používá pro rozbor pitné vody, sacharosy, kuchyňské soli a jiných rozpustných látek nebo pro rozbor kapalin, obsahujících sloučeniny, inhibující růst zjišťovaných mikroorganismů. Pro zjišťování bakterií se používají membránové filtry o průměru pórů 0,3  $\mu\text{m}$ . Citlivost metody je 1 MO/ 100ml.<sup>3)</sup>

Příklad komerčně dodávaného testu – **M COLI BLUE24 (viz obr. 7):**

Jedná se o zjednodušenou membránovou filtraci, která je spolehlivá a rychlá. Je to produkt společnosti HACH. Slouží k detekci koliformních bakterií (červená barva) a *E. coli* (modrá barva) na filtru během 24 hodin. Jednoduchá manipulace, díky předem připraveným a rozděleným dávkám selektivního média a Petriho misce s filtrem.<sup>15)</sup>



### 3.1.4 Metoda MPN

MPN (Most Probable Number) – neboli metoda nejvíce pravděpodobného počtu je metoda na stanovení počtu bakterií ve vzorcích, které není možné filtrovat. Metoda je velice pracná a proto je laboratořemi často přehlížena. Namísto ní se provádějí metody, které jsou jednodušší a rychlejší. Navíc stanovení tímto způsobem není vyžadováno žádnou normou pro mikrobiologická stanovení. Metoda MPN se doporučuje v případě zakaleného vzorku, limitované expertízy, či v případech, kdy by nebyla metodou membránové filtrace shromážděna přiměřená data. Metoda MPN používá určité množství zkumavek (založeno na předpokládané populaci bakterií ve vzorku), obsahujících specifické médium a vzorek vody. Principem metody je naočkování několika stejných objemů vzorku do zkumavek (s plynovkami) v ředících řadách. Nejvíce pravděpodobný počet se stanovuje pouze ve zkumavkách s pozitivní reakcí (ředěním vzorků jsou poskytovány jak negativní, tak i pozitivní reakce). Pro každý objem ředění se používá stejný počet zkumavek, obsahujících kultivační médium; jednotlivé série zkumavek jsou ředěny v poměru 1:10.<sup>16)</sup>

Pro každý stupeň ředění se volí minimálně 3 zkumavky (pokud je potřeba obdržet přesnější výsledky, lze použít 5 zkumavek v jedné sérii). Po inkubaci je v každé zkumavce vyšetřen růst všech organismů, v každém stupni ředění se vyhodnocují zkumavky s pozitivní reakcí. Vyberou se vždy takové 3 po sobě jdoucí koncentrace vzorku, u kterých bylo zaznamenáno několik pozitivních i negativních výsledků, přičemž se vybere ta nejnižší koncentrace, u které se projevila ještě pozitivní reakce spolu se dvěma předcházejícími stupni ředění. Počet zkumavek zachycujících růst odpovídá statistickému vyhodnocení výtěžku nejvíce pravděpodobného počtu organismů ve vzorku.<sup>16)</sup>

### 3.2 Nefelometrické stanovení počtů mikroorganismů

Nefelometrické stanovení spočívá ve zjištění počtu buněk v čiré kapalině na základě intenzity světla odraženého od jednotlivých buněk. Metoda je velmi rychlá a citlivá. Umožňuje zjištění počtu buněk počínaje koncentrací  $10^5$  bakterií/ml do koncentrace  $10^7$  bakterií/ml. Nejvhodnější je pro krátké tyčinky nebo koky, při delších tyčinkách nebo řetízcích může dojít k nepravidelnostem. Touto metodou zjišťujeme celkový počet buněk na základě kalibrační křivky zhotovené pomocí přímého mikroskopického počítání buněk.<sup>3)</sup>

## 4. Test na přítomnost či nepřítomnost bakterií

Jedná se o jednoduché monitorování výskytu mikroorganismů. V laboratořích byly vyvinuty testy na přítomnost/nepřítomnost (presence-absence) mikroorganismů.

### 4.1 P/A metoda

Příkladem kvalitativní analýzy, která neposkytuje zjištění počtu přítomných mikroorganismů, je test na přítomnost a nepřítomnost, pod zkratkou P/A. Je to účinný screeningový test v případě potřeby stanovení 0 KTJ koliformních bakterií u velkého množství vzorků. Díky jednoduchosti testu nejsou u osob provádějících test vyžadovány odborné zkušenosti. Metody požadují 100 ml vzorku a P/A médium s bromkresolovou červení (obsahuje laktózu, lauryl-tryptózu a indikátor bromkresolovou červeň) či lauryl-tryptózový bujón s bombičkou. Vzorek je inkubován po dobu 24 až 48 hodin při teplotě  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Pozitivním výsledkem je žluté zbarvení, indikující tvorbu kyseliny při fermentaci laktózy.<sup>4)</sup>

Příkladem komerčně dodávaného testu P/A je společnost HACH (viz **obr. 8**): Zjišťuje se, zda se jedná o fekální znečištění či nikoli. Po uplynutí inkubační doby změna barvy z červené na žlutou jasně indikuje přítomnost i jediné koliformní bakterie, fluorescence pak indikuje přítomnost *E. coli*.<sup>15)</sup>



### 4.2 BART™ test

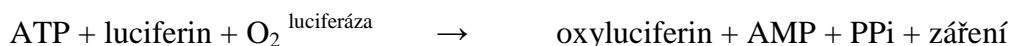
Test biologické aktivity BART™ je další metodou pro zjištění přítomnosti skupin bakterií a řas ve vodě. Tento test byl původně vyvinut dle *Institute of Drycon Bioconcepts* pro diagnózy zakalených studní. Test umožňuje snadný způsob detekce specifických skupin mikroorganismů ve vodě dříve, než způsobí problémy. Další možná použití testu zahrnují monitorování chladících věží a teploměrných zařízení, městských odpadních vod, soukromých studní, odpadních vod s rizikovými a nebezpečnými látkami, rafinérií a vrtných polí, rybníků a léčivých lázní, elektráren průmyslových vod a papíren. V případě tzv. BART™ testů se do výrobcem připravené sterilní zkumavky (50 ml) odebere vzorek vody, 15 ml vzorku se přelije do další speciální zkumavky, ve které jsou v podobě prášku přítomny reagentie (dle indikátoru). Tato zkumavka se uzavře a dle návodu od výrobce se její obsah protřepe/neprotřepe a kultivuje se buď

v horizontální/vertikální poloze ve tmě/na světle. Každý den se sleduje barva média a případné reakce, např. tvorba bublinek, sedimentu či barevných proužků. Výsledkem testu BART<sup>TM</sup> je pak přibližný počet bakterií KTJ.ml<sup>-1</sup>, který se odečte z diagramu či barevné reakce testu. Komerčně jsou dodávány testy pro železité bakterie, fluorescenční pseudomonády, nitrifikační bakterie, denitrifikační bakterie, sulfát redukující bakterie a řasy. Komerčně jsou dodávány testy například od společnosti HACH.<sup>4)</sup>

## 5. Luminiscenční metoda

Luminiscenční metoda je metodou, kde se stanovuje ATP. V živých buňkách se energie uchovává nejčastěji ve formě ATP (adenosintrifosfát). Množství ATP v živých buňkách lze měřit pomocí luminometrie, což je metoda měřící intenzitu záření vytvořeného chemickou reakcí:

### Rovnice č. 1:



Látky luciferin a luciferáza použité v testu byly izolovány ze zářících světlušek. Množství produkovaného záření je přímo úměrné množství ATP ve vzorku a množství ATP tedy informuje o množství buněk obsažených ve vzorku. Množství ATP obsažené v eukaryotických buňkách živočichů, rostlin nebo kvasinek a plísní je asi 10-12 g/buňku. Jedna bakteriální buňka obsahuje pouze 1/1000 množství ATP obsaženého v eukaryotických buňkách. Obsah ATP v buňce není stálý, ale je ovlivňován např. strukturou buňky, stadiem růstu a růstovou teplotou. Při luminometrii se vzorek odebírá stíráním ohraničeného místa pomocí stěrového tampónu navlhčeného roztokem NaCl. Vatová část tampónu se převede do reagenční ampulky, kde se tampón vytřepá. Poté se přidají další činidla nezbytná pro průběh reakce a měří se intenzita emitovaného záření pomocí speciálního zařízení, luminometru. Výsledky jsou vyjadřovány jako relativní jednotky záření (RLU). Největším problémem při měření vzorků potravin je, jak odlišit ATP pocházející z mikrobiálních buněk od ATP ostatních buněk. V přímé analýze vzorků potravin není proto luminometrie použitelná, protože tyto vzorky obsahují ATP převážně živočišného a rostlinného původu. Luminometrii lze s výhodou použít pro povrchové hygienické vzorky. Výsledky totiž vyjadřují také přítomnost organických zbytků, které mohou sloužit jako živiny pro mikroby na kontaminovaných površích.<sup>1),13)</sup>

Příklad komerčně dodávaných testů značky BioFix®ATP. Rychlé testy pro kontrolu hygieny (HACCP) BioFix ATP obsahují bioluminiscenční činidla - jako první na světě stabilní i v kapalné formě. Poskytují dosud nepoznanou jistotu stanovení a vynikající reprodukovatelnost analytických výsledků. V současnosti jde o nejcitlivější dostupný hygienický rychlý test.<sup>17)</sup> Luminometr BioFix Lumi-10: Při kontrole sanitace - rychlém monitoringu hygieny výrobních či pracovních ploch v potravinářství, se z velkou výhodou uplatňují rychlé testy bioluminiscence (vlastní vyzařování světla) ATP. Ten je obsažen ve všech živých buňkách i jejich zbytcích a jeho detekce souvisí s hygienickou úrovní daného kritického místa. Výsledky do pár minut.<sup>18)</sup>

## 6. Miniaturizace biochemických testů

V současné době miniaturizace se v oboru mikrobiologie stále častěji začínají využívat sady tzv. mikrotestů (diagnostických souprav), které usnadňují provedení jednotlivých analýz.<sup>4)</sup> Klasická identifikace využívající řady biochemických testů je časově i materiálově náročná.<sup>19)</sup> Na základě fyziologických vlastností MO se zjišťuje schopnost fermentace různých cukrů, schopnost utilizace různých substrátů jako zdroje uhlíku, hydrolýza některých substrátů, aktivita enzymů, citlivost ke žluči a deoxycholátu, produkce specifických metabolitů, hemolýza apod.<sup>4)</sup>

Mikrotesty jsou většinou založeny na stejném principu jako tradiční „pestrá řada“ biochemických testů, jsou však miniaturizovány, takže odpadá příprava kultivačních médií, jejich sterilizace, příprava laboratorního nádobí apod. Obvykle se jedná o reprezentativní soubor biochemických testů uspořádaných na plastových mikrodestičkách. V jamkách těchto destiček jsou dehydratovaná diagnostická média s příslušnými substráty. Očkuje se suspenzí z čistých kultur o předem dané hustotě. Po 18 – 24 hodinové inkubaci, kdy dochází ke změnám ve zbarvení médií, se výsledky odečítají a vyhodnocují se buď převedením na příslušný kód, podle něhož se pak provede identifikace v identifikačním registru, nebo se výsledky vyhodnotí pomocí počítačových programů. Každá souprava obsahuje návod na použití, tabulky pro zapisování výsledků, pomocná činidla (parafinový olej a reagentie). Všechny tyto soupravy jsou určeny pro rychlou a poměrně spolehlivou identifikaci bakterií izolovaných z klinického materiálu, potravin, pitné i povrchové vody, půdy apod.<sup>19)</sup>

Příkladem komerčně dodávaných mikrotestů jsou např. tyto testy: **API-systém** (firmy Analy lab Products, Inc., N.Y.) s několika řadami mikrozkupek s testy v jedné vylisované destičce (API 20E – identifikace *Enterobacteriaceae* a další G- tyčinky; API 20NE – pro nefermentující G- tyčinky; API 20A – pro anaerobní bakterie; API 20C AUX – pro kvasinky; API S 20 – pro streptokoky; Rapid ID 32A – pro anaerobní bakterie – po 4 hodinové inkubaci za anaerobních podmínek; API NH pro identifikaci *Neisseria*, *Haemophilus* a *Branhamella catarrhalis*; API Listeria – pro listerie; API Staph – pro stafylokoky). **ENTEROTUBE-systém** (firma ROCHE Diagnostic Division) představovaný speciální plastovou trubicí rozdělenou přepážkami na 8 oddělení (středem trubice prochází očkovací jehle, kterou se vzorek přetáhne z jednoho konce na druhý). **Mikro-La-test** (firma Lachema Brno) obsahující dehydratovaná diagnostická média umístěná v jamkách mikrotitračních destiček, na kterých lze identifikovat 8 až 12 kmenů (ENTEROtest – identifikace střevních bakterií z čeledi



*Enterobacteriaceae* a *Vibrionaceae*; NEFERMtest – diferenciace druhů G-nefermentujících tyčinek; STAPHYtest – identifikace stafylokoků; STREPTOtest – identifikace streptokoků; ANAEROtest – identifikace anaerobních bakterií).<sup>4), 19)</sup>

## 7. Závěr

Byla zpracována literární rešerše se zaměřením na rychlé metody detekce a stanovení MO v potravinách a ve vodě. V této práci byly vysvětleny principy jednotlivých metod. Screeningové metody se dělí na přímé, nepřímé a vyvíjené nepřímé metody.

**Přímé metody** nás informují přímo o počtu bakterií a slouží k monitorování mikrobiální kontaminace.<sup>1)</sup> Mezi tyto metody patří: otiskové metody, stěrové metody, metoda membránové filtrace, metoda MPN, nefelometrické stanovení počtu mikroorganismů, testy na přítomnost či nepřítomnost bakterií..

**Otisková metoda** se nejlépe uplatňuje u rovných povrchů, ale např. dřevěné povrchy mohou být pro odběr vzorků obtížným místem. Nerovný povrch může znemožnit dotek celého povrchu agarů s vyšetřovaným místem, což vede k odběru vzorku, který není pro dané místo reprezentativní. Při otiskové metodě adheruje na povrch testovací plotny pouze asi 10-20 % mikrobů nacházejících se na vyšetřovaném povrchu, a to v závislosti na druhu povrchového materiálu. Proto je důležité používat pro sledování hygienické úrovně určitých povrchů vždy tutéž metodu.<sup>1)</sup>

**Stěrová metoda** používaná spolu s šablonou vyhovuje téměř všem povrchům, avšak odebrání reprezentativního vzorku může být obtížné. Stěrovou metodou se nejlépe vyšetřují malé náčiní, oblé tvary nebo nerovné povrchy. Reprodukovatelnost výsledků stěrové metody je velmi závislá na kvalifikaci pracovníka odebírajícího vzorky. Zvládnutí metody vyžaduje praxi a pečlivost. Na odběrový tampon by měl být vyvinut tlak 0,1 kg.cm<sup>-2</sup>. Použití alginátových odběrových tampónů anebo tampónů s aktivním uhlím může snížit odběrovou chybu. Metoda rovněž vyžaduje laboratorní zázemí pro kultivaci vzorků v Petriho miskách. Provedení stěrové metody je ve srovnání s otiskovou metodou pomalejší, dražší a vyžaduje větší zkušenost provádějící osoby. Na straně druhé jsou však výsledky přesnější, než je tomu u otiskové metody.<sup>1)</sup>

**Metoda membránové filtrace** patří mezi nejpřesnější metody detekce MO a vyniká svou citlivostí (1CFU/100 ml). Výhodou je, že během inkubační doby dojde k pomnožení buněk pouze u sledovaných druhů MO, což je dáno obsahem konkrétního reagentu v půdě. Dojde k barevnému rozlišení a počet kolonií na misce odpovídá počtu MO přítomných ve vzorku. Nevýhodou této metody je to, že ji lze použít pouze u naprosto čirých vzorků.

**Metoda MPN** se používá ve vzorcích, které není možné filtrovat. Metoda je velice pracná. Stanovení tímto způsobem není vyžadováno žádnou normou pro

mikrobiologická stanovení. Metoda MPN se doporučuje v případě zakaleného vzorku, limitované expertízy, či v případech, kdy by nebyla metodou membránové filtrace shromážděna přiměřená data.

**Nefelometrickým stanovením** se zjišťuje počet buněk o koncentraci  $10^5 - 10^7$  bakterií/ml v čiré kapalině. Vhodné pouze pro krátké tyčinky nebo koky a nutné zhotovit kalibrační křivku.

**Testy na přítomnost či nepřítomnost bakterií:** mezi tyto testy patří P/A metoda a BART™ test. Jedná se o jednoduché monitorování výskytu MO, které jsou detekovány pomocí barevné změny, zákalu nebo fluorescence půdy v kapalinách.

**Nepřímé metody** nás neinformují přímo o počtu bakterií, ale měří některé vlastnosti vázané na mikroby, monitorování nečistot. Jsou vhodné pro zpracování a monitoring podnikových standardů hygieny.<sup>1)</sup> Mezi tyto metody patří: luminiscenční metoda a mikrotesty.

U **luminometrie** je stejně jako u kultivačních metod kritickým místem odběr vzorků, při kterém musí být zajištěna reprezentativnost. Zdrojem chyb bývá tvar vyšetřovaného povrchu nebo jeho nestejněměrná kontaminace. Speciálním problémem je zamezení kontaminace ATP. Obsah ATP v lidských buňkách převyšuje jeho obsah v buňkách bakterií. Proto může několik odpadlých epidermálních buněk výrazně změnit výsledek vyšetření. Nezbytné je tedy během odběru materiálu a manipulace s činidly používat jednorázové rukavice. Absolutně nezbytná je rovněž sterilita ostatního používaného náčiní. Výhody luminometrie: rychlé výsledky (řádově minuty), vedle mikrobů prokazuje i znečištění, zcela jednoduché použití (po zapracování) a výsledek je vyjádřen číslem. Nevýhody luminometrie: nákladná investice, nutné pečlivé zpracování, aby se eliminovaly zdroje chyb a jedná se o nestandardizovaná metoda.<sup>1)</sup>

**Mikrotesty** jsou diagnostické soupravy, které usnadňují provedení jednotlivých analýz. Mikrotesty jsou většinou založeny na stejném principu jako tradiční „pestrá řada“ biochemických testů, jsou však miniaturizovány, takže odpadá příprava kultivačních médií, jejich sterilizace, příprava laboratorního nádobí apod. Všechny tyto soupravy jsou určeny pro rychlou a poměrně spolehlivou identifikaci bakterií izolovaných z klinického materiálu, potravin, pitné i povrchové vody, půdy apod.

**Vyvíjené nepřímé metody** - mezi tyto metody například patří: turbidimetrie, kalometrie, fluorometrie, radiometrie, mikrokalorimetrie, katalázové testy, endotoxinový test (LAL) a biosenzory.<sup>1)</sup> Za zmínku stojí například **endotoxinový test**, který dává pozitivní reakci už po 1 hodině inkubace při 37°C. Umožňuje nám detekci

koliformních bakterií v potravinách. Dále například **radiometrie** a tato metoda se používá v potravinářství pro rozbor zmražených potravin a potravinářských surovin. Výsledek se získá za 4 – 6 hodin.

## 8. Seznam literatury

- 1) [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/navody/oborI/MO.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/MO.pdf) (cit. 2009-21-01).
- 2) <http://biomikro.vscht.cz/trp/documents/potrmik/Rychlemetody.pdf>  
(cit. 2009-21-01).
- 3) <http://biomikro.vscht.cz/documents/labmikro/skriptalab.pdf>  
(cit. 2009-21 – 01; str. 100, 103,104,121).
- 4) [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-978-80-7080-676-0/pages-img/187.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-676-0/pages-img/187.html) (cit. 2009-20-07; str. 192-196)
- 5) <http://www.noack.cz/products.asp?idk=142> (cit. 2009-20-07).
- 6) <http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?66666UuZjcFSLXTt4XME5X T6EVuQEcuZgVs6EVs6E666666--> (cit. 2009-20-07).
- 7) [http://biomikro.vscht.cz/documents/potrmik/VaV\\_podminky.pdf](http://biomikro.vscht.cz/documents/potrmik/VaV_podminky.pdf)  
(cit. 2009-21-01).
- 8) [http://www.oriondiagnostica.cz/files/oriondiagnostica/MODEL%20TABULKY/502-06GB\\_Hygicult\\_Model\\_Chart.pdf](http://www.oriondiagnostica.cz/files/oriondiagnostica/MODEL%20TABULKY/502-06GB_Hygicult_Model_Chart.pdf) (cit. 2009-20-07).
- 9) <http://www.oriondiagnostica.cz/produkty2?product=10327280&group=6.01>  
(cit. 2009-20-07).
- 10) <http://www.skatec.cz/mi-pri-qswab.php> (cit. 2009-20-07).
- 11) [http://www.skatec.cz/source/qswab\\_qdloop\\_datasheet.pdf](http://www.skatec.cz/source/qswab_qdloop_datasheet.pdf) (cit. 2009-20-07).
- 12) <http://www.skatec.cz/mi-pat-pchek.php> (cit. 2009-21-07).
- 13) [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/navody/oborI/MO3.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/MO3.pdf)  
(cit. 2009-21-07).
- 14) <http://www.skatec.cz/mi-pat-listeria.php> (cit. 2009- 22-07)
- 15) <http://www.ekotechnika.com/files/Biologie.pdf> (cit. 2009-22-07)
- 16) [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=M013](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=M013)  
(cit. 2009-22-07)
- 17) <http://www.bangco.cz/Down/Rapid/Rapid02c.pdf> (cit. 2009-22-07)
- 18) <http://www.bangco.net/index.php?file=z012001> (cit. 2009-22-07)
- 19) Vytrásová J., Bílková Z.: *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*, Pardubice 1998, str. 88, 89.