



CytoQuant®

Przełomowe narzędzie
do monitorowania mikrobiologicznego

Making the World's Food Safer

Romer
Labs 

CytoQuant® - czym jest Mobilny Cytometr Przepływowy?

Cytometria przepływowa oparta na impedancji to bezpośrednia, ilościowa metoda mikrobiologiczna stosowana do zliczania **żywych bakterii** zawieszonych w czystej wodzie.

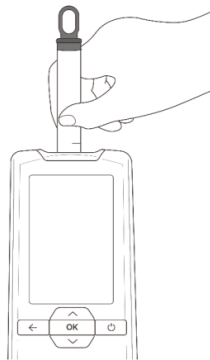
Cytometria - to metoda naukowa, dzięki której można zmierzyć różne właściwości pojedynczych komórek, takie jak rozmiar, kształt, ilość.

Impedancja – to po prostu opór, jaki materiał stawia prądowi zmiennemu.



Jak działa CytoQuant® ?

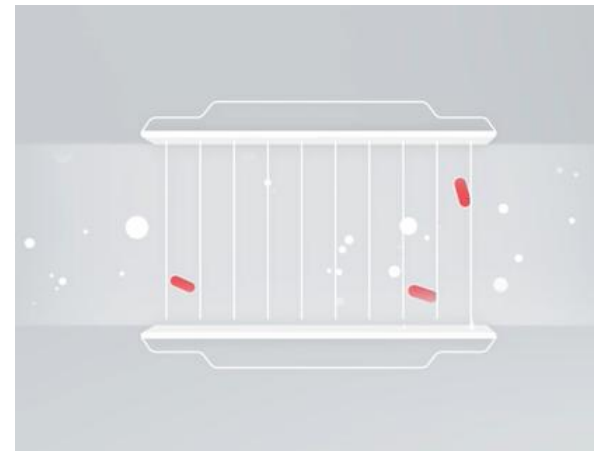
- Elektrody znajdujące się w kanale przepływowym generują **prąd elektryczny o niskich i wysokich częstotliwościach**.
- Po umieszczeniu fiolki w urządzeniu, cząstki zawieszone w próbce przemieszczają się między elektrodami wywołując mierzalne zmiany prądu elektrycznego (zmiany impedancji), które są przekształcane na dwa oddzielne zliczenia: **nieuszkodzone komórki** oraz inne **cząstki stałe**.



Jak działa CytoQuant® ?

CytoQuant® potrafi odróżnić **żywe bakterie** od innych cząstek zawieszonych w próbce na podstawie unikalnych właściwości elektrycznych żywych komórek.

- **Żywe komórki** posiadają **nieuszkodzoną błonę komórkową** oraz **cytoplazmę**, co sprawia, że w przeciwieństwie do innych cząstek przechodzących przez kanał przepływowy mogą przewodzić prąd lub stawiać mu opór w zależności od jego częstotliwości.
- Przy **niskich częstotliwościach**, izolacyjna właściwość błony komórkowej uniemożliwia przenikanie przez nią prądu elektrycznego. Podczas **gdy wyższe częstotliwości**, mogą przeniknąć przez błonę komórkową i cytoplazmę.
- W ten sposób CytoQuant jest w stanie odróżnić żywe komórki bakteryjne od innych cząstek zawieszonych w próbce.



Jak działa CytoQuant® ?

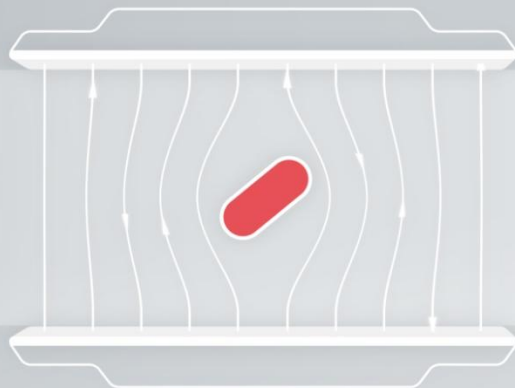
Przewodzące i nieprzewodzące **cząstki** przy wysokich i niskich częstotliwościach prądu



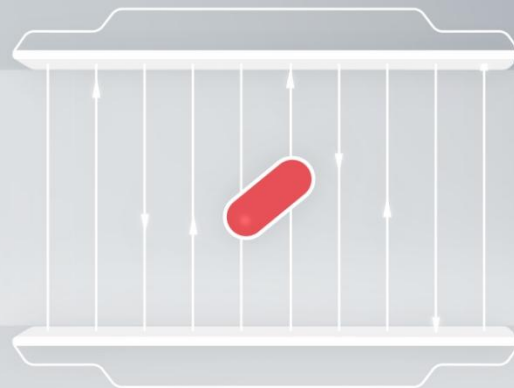
Jak działa CytoQuant® ?

Żywe komórki bakteryjne przy wysokich i niskich częstotliwościach prądu

BAKTERIE



NISKA CZĘSTOTLIWOŚĆ



WYSOKA CZĘSTOTLIWOŚĆ

Co tak naprawdę mierzy CytoQuant® ?

- Oznaczone parametry: **nieuszkodzone komórki (IC)** i **inne cząstki stałe (P)**
- Dwa programy pomiarowe: **30 sekund** i **120 sekund**

Parametr		30 sekund	120 sekund
Dolna granica oznaczalności	IC (intact cells)	15 000 / ml	5 000 / ml
	P (particles)	50 000 / ml	50 000 / ml
Górna granica oznaczalności	IC (intact cells)	10 000 000 / ml	10 000 000 / ml
	P (particles)	5 000 000 / ml	5 000 000 / ml
Koszt		1 pomiar	3 pomiary

Co tak naprawdę mierzy CytoQuant® ?

- Częstki, które są większe niż **0,5 μm** , a jednocześnie na tyle małe, aby mogły przejść przez otwór o średnicy 10 μm w kanale przepływowym.
- **Drożdże i pleśnie** nie są wykrywane, ponieważ są zbyt duże
- **Wirusy** nie są wykrywane, ponieważ są zbyt małe (zwykle są mniejsze niż 300 nm)
- **Endospory bakteryjne i zarodniki grzybów** liczone są jako inne **częstki stałe**
- **Martwe komórki bakteryjne** także liczone są jako inne **częstki stałe**
- CytoQuant® **nie zlicza agregatów komórek ani komórek uwięzionych w biofilmie.**
Swobodnie pływające komórki oddzielone od biofilmu przez wymaz liczone są jak każda inna bakteria. Energiczne wymazywanie zwiększa szansę na wychwycenie bakterii z biofilmu.

Co tak naprawdę mierzy CytoQuant® ?

CytoQuant® zlicza wszystkie rodzaje **komórek bakteryjnych**, niezależnie od wymagań wzrostowych i stanu fizjologicznego, co pozwala na bezpośrednie oznaczenie całkowitej liczby **żywych komórek**.

- tlenowe, beztlenowe, tolerujące tlen, mikroaerofilne
- żywe, ale niehodowlane
- psychrotroficzne, mezofilne, termofilne, ekstremofilne
- szybko/wolno rosnące, czas lag/faza adaptacyjna
- wymagające (hodowlane), itd.



- Żadne stałe ani płynne podłoże nie jest w stanie objąć tak szerokiego zakresu wymagań!
- Między bakteriami w naturalnych społecznościach mikrobiologicznych zachodzą złożone interakcje.



Bezpośrednie zliczanie bakterii (mikroskop, cytometria) w naturalnych społecznościach mikrobiologicznych jest zazwyczaj wyższe niż zliczanie pośrednie (hodowlane).

Co tak naprawdę mierzy CytoQuant® ?

CytoQuant® zlicza także inne **cząstki stałe**, zarówno organiczne, jak i nieorganiczne oraz jednorodne lub niejednorodne.

- Są to wszelkie pozostałości niesklasyfikowane jako żywe bakterie, czyli: **bakterie niezdolne do życia, nierozpuszczalne resztki pokarmowe (białka, błonnik, sole), a także endospory bakteryjne lub zarodniki grzybów.**
- Liczba cząstek jest wskaźnikiem skuteczności przeprowadzonego czyszczenia, ale nie dezynfekcji.
- Powtarzalność wyników w tym przypadku jest mniejsza w porównaniu do liczby komórek z nieuszkodzoną błoną ponieważ materiały eksploatacyjne również emitują cząstki.



Zliczanie cząstek powinno być traktowane jako funkcja dodatkowa, mająca na celu dostarczenie uzupełniających informacji w stosunku do liczby żywych komórek.

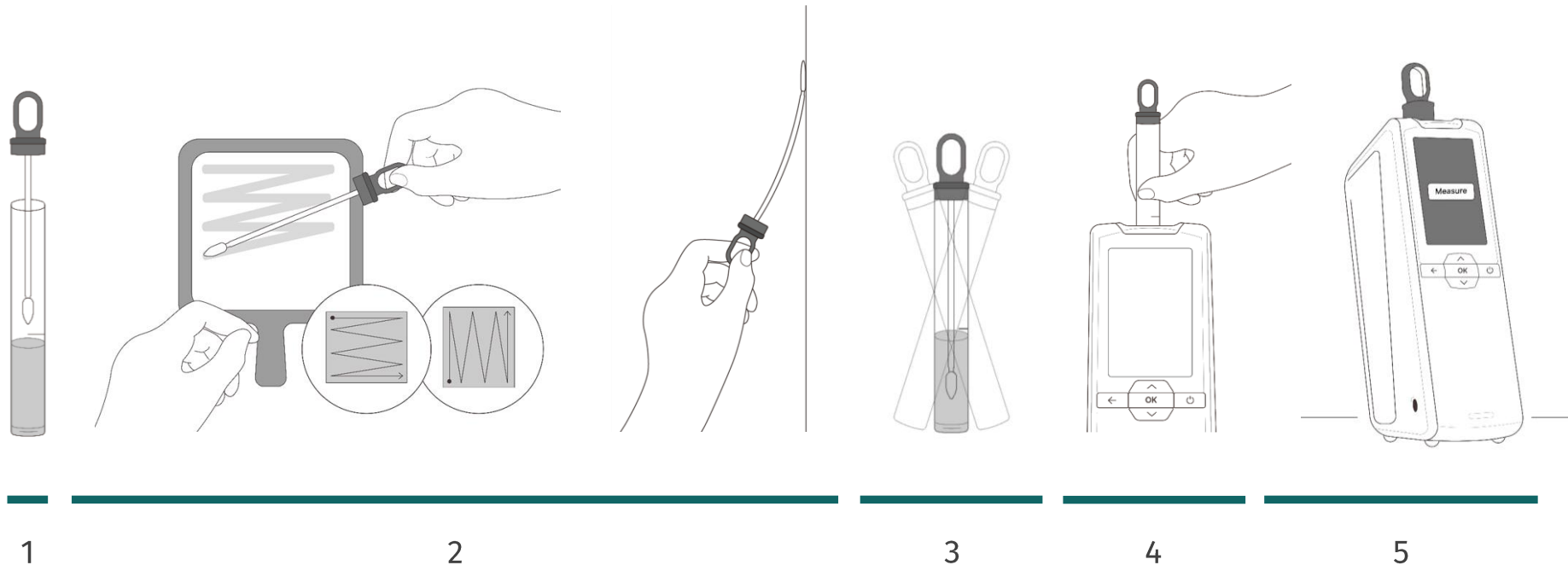
Na co powinno się zwracać uwagę?

- Analizowane próbki muszą być **wyraźnie czyste** ponieważ **liczba cząstek > 5 000 000 / ml** spowoduje, że próbka będzie nieczytelna również dla żywych bakterii.
- Przewodność próbek ciekłych musi się mieścić w zakresie **650-950 μS / cm**
→ można ją regulować dodając roztwór elektrolitu.
- Po każdym umieszczeniu tej samej fiolki w urządzeniu CytoQuant **uzyskamy różne wyniki**, ponieważ mikroorganizmy nie są równomiernie rozmieszczone w próbce.
- **Różnice $\pm$ 100% są normalne** dla zliczeń w pobliżu dolnej granicy oznaczalności.



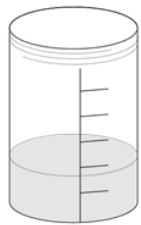
CytoQuant® - schemat postępowania

Protokół badania powierzchni

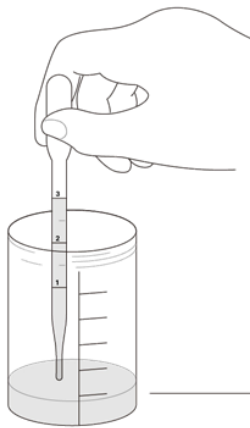


CytoQuant® - schemat postępowania

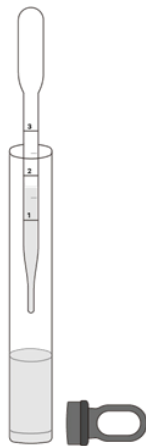
Protokół badania wody



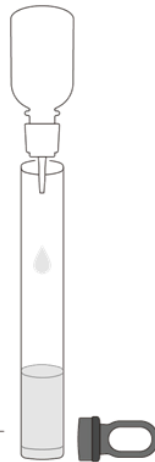
1



2



3



4



5



6

CytoQuant® - materiały eksploatacyjne



Fiolka
do głębokiego
czyszczenia

1 na tydzień



Fiolka
do czyszczenia

1 na dzień



Zestaw
wymazowy

1 na oznaczenie



Pusta fiolka
(do cieczy)

1 na oznaczenie



CountCell™
Kanał przepływowy

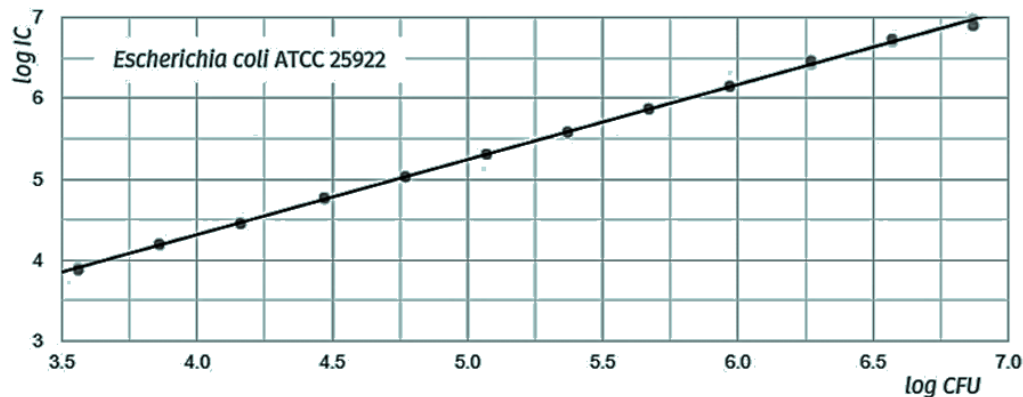
800 pomiarów*

*800 krótkich pomiarów (30 s).
Jeden długi pomiar (120 s) liczy się jako 3 krótkie pomiary.

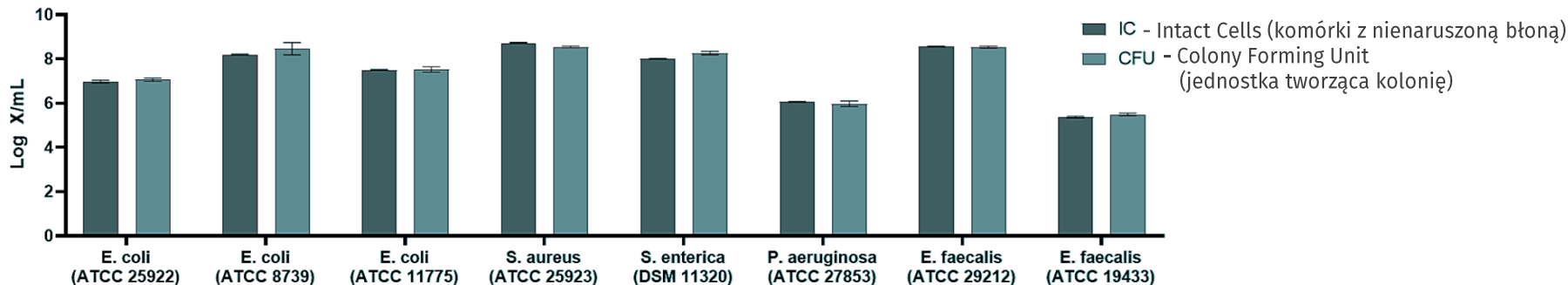
CytoQuant® - informacje do zamówienia

Nr produktu	Produkt	Ilość
10006469	CytoQuant® Flow Cytometer (zawiera CountCell™) - Cytometr	1 szt.
10006471	CytoQuant® CountCell™ - Kanał przepływowy	1 szt.
10006468	CytoQuant® Swab Vial - Zestaw wymazowy	72 szt.
10007101	CytoQuant® Aqua Vial - Pusta fiolka (do cieczy)	72 szt.
10007028	CytoQuant® Cleaning Vial - Fiolka do czyszczenia	72 szt.
10007081	CytoQuant® Deep Cleaning Vial - Fiolka do głębokiego czyszczenia	8 szt.
10007195	CytoQuant® Operational Qualification Kit - Zestaw do kwalifikacji operacyjnej	8 szt.
10007108	CytoQuant® Case - Walizka	1 szt.

Korelacja z metodą hodowlaną (liczeniem kolonii na płytkach)?



- Bliskie korelacje można uzyskać między zliczaniem IC a liczbą CFU, ale tylko dla świeżych, czystych kultur dobrze scharakteryzowanych szczepów.
- Zliczanie IC jest wyższe w przypadku próbek naturalnie skażonych.



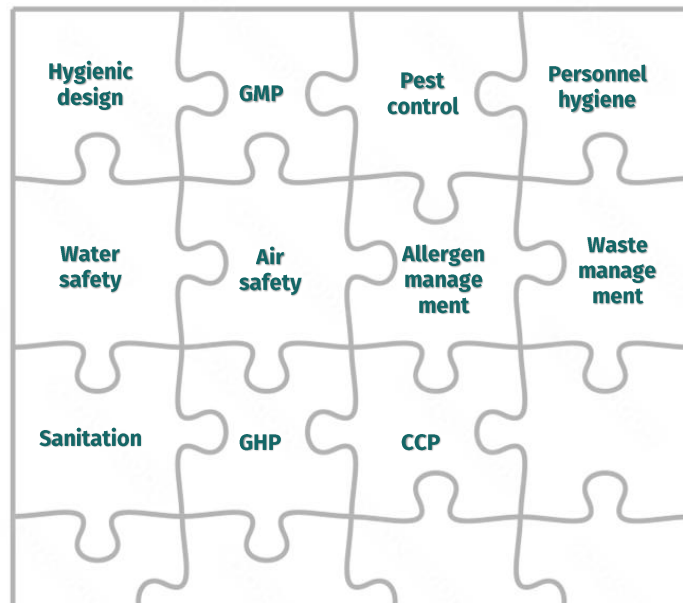


Monitorowanie sanitarnego stanu (mycie i dezynfekcja) za pomocą **CytoQuant®**

Jak kontrolować zanieczyszczenia?

Środowisko produkcyjne jest głównym rezerwuarem mikroorganizmów i czynnikiem sprzyjającym zakażeniom krzyżowym

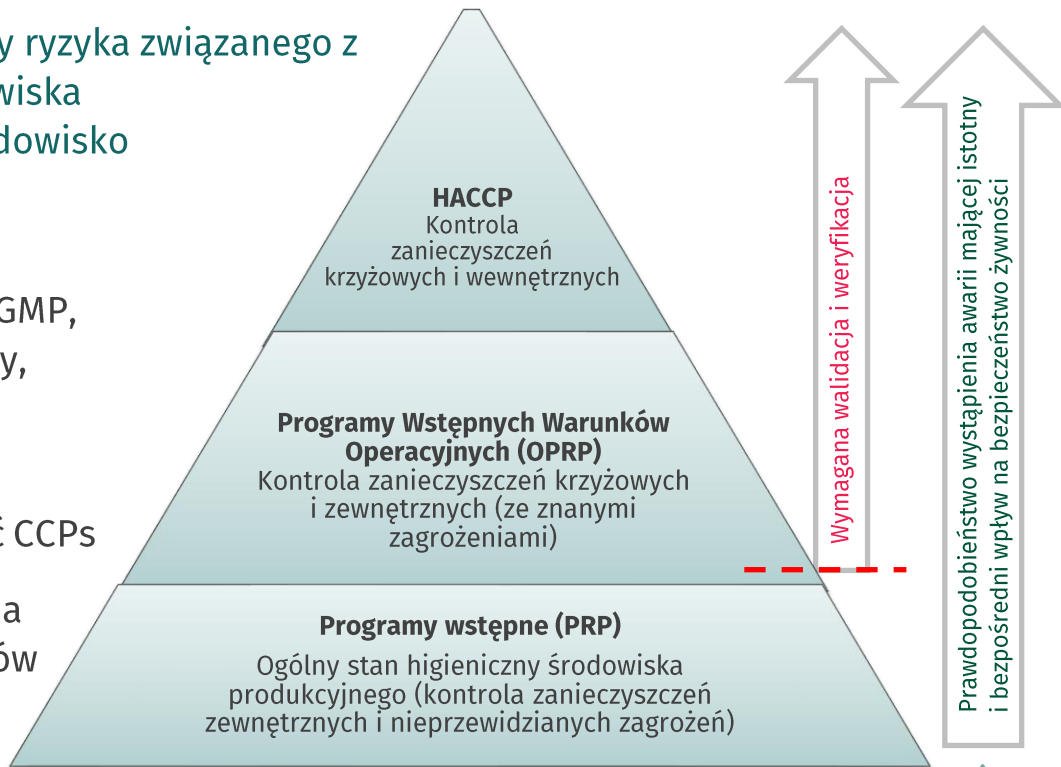
- Programy wstępne stanowią podstawę każdego systemu zarządzania bezpieczeństwem żywności i większość z nich ma na celu kontrolowanie zanieczyszczeń zewnętrznych (ze środowiska) oraz zanieczyszczeń krzyżowych pochodzących ze środowiska → istotnych również dla jakości i okresu przydatności do spożycia
- Coraz więcej zdarzeń związanych z bezpieczeństwem żywności wiąże się z brakiem odpowiednich programów wstępnych → przepisy i normy podkreślają znaczenie zapewnienia skuteczności programów wstępnych



Programy monitorowania środowiska (EMPs)

Przeznaczony do wspierania procesów oceny ryzyka związanego z zanieczyszczeniami pochodzącymi ze środowiska produkcyjnego/przenoszonymi przez to środowisko

- Poinformuj o weryfikacji konkretnych programów wstępnych (np. sanitarnych, GMP, GHP, higieny personelu, uzdatniania wody, klimatyzacji), śledzeniu skażeń i analizie przyczyn źródłowych
- Wyjątkowo należy również poinformować CCPs
- Wymaga zdefiniowania planów pobierania próbek, metodologii testowania i kryteriów akceptowalności → a następnie podjęcia działań



Walidacja, monitorowanie i weryfikacja

Monitorowanie jest zazwyczaj przeprowadzane w celu weryfikacji, ale jest również wymagane w walidacji, w celu wdrożenia kontroli procesów.

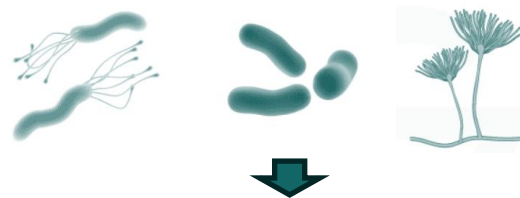
- Walidacja: udowodnienie, że środki kontroli mogą wyeliminować zagrożenie lub zredukować je do akceptowalnego poziomu → kontrole procesu (tj. wskaźniki) muszą zostać zdefiniowane na podstawie oceny ryzyka
- Monitorowanie: rutynowa czynność, w ramach której zbierane są dane za pomocą kontroli procesów → udowadnianie, że środki kontroli są stosowane zgodnie z przeznaczeniem
- Weryfikacja: udowodnienie, że środki kontroli rzeczywiście eliminują zagrożenie lub redukują je do akceptowalnego poziomu → dane z monitoringu są analizowane i potwierdzane innymi dostępnymi zbiorami danych



Metody monitorowania analitycznego ⁽¹⁾

EMP muszą zapewniać dokładny pomiar ryzyka, aby umożliwić dokładniejsze ograniczanie ryzyka

- W idealnym przypadku informują one o skuteczności OPRP/PRP, ale także umożliwiają szybką interwencję, a nie tylko szeroko zakrojone działania zapobiegawcze
- Metody ukierunkowane na mikroorganizmy (patogenne, wskaźnikowe, indeksowe lub powodujące psucie się) lepiej nadają się do oceny ryzyka
- Większość EMP obejmuje metody wykrywania patogenów oraz metodę półilościową/półmetodę ilościową (metodę płytkową, opartą na ATP lub inną?)



Mikroorganizmy są obecne, dlatego środki mające na celu redukcję mikroorganizmów nie są skuteczne

Obecne są pozostałości organiczne, dlatego istnieje duże prawdopodobieństwo, że mikroorganizmy również będą istnieć i się rozmnażać



Metody monitorowania analitycznego ⁽²⁾

Metody wykrywania patogenów ujawniają tylko część historii, często jest już za późno → patogen zdążył już osadzić się w zakładzie

- Monitorowanie patogenów jest często wymagane przepisami.
- Metody wykrywania są najbardziej rozpowszechnione, zwłaszcza w obszarach wysokiego ryzyka → wymagane są reprezentatywne próbki
- Wykrywanie patogenów nie dostarcza zbyt wielu informacji na temat skuteczności środków kontroli → jest niezbędne do śledzenia skażenia i identyfikowania rezerwuarów
- W niektórych przypadkach stosuje się metody ilościowe (systemy wczesnego ostrzegania oparte na mikroorganizmach wskaźnikowych)



Metody monitorowania analitycznego ⁽³⁾

Menedżerowie ds. ryzyka musieli wybierać między klasyczną mikrobiologią ilościową a bioluminescencją ATP

- Metody ilościowe lub półilościowe są niezbędne, ponieważ kontrola procesów → informuje o skuteczności środków kontroli (np. sanitarnych)
- Większość dostępnych ilościowych metod mikrobiologicznych opiera się na hodowli → powolne i wąskie wyniki
- ATP jest słabym miernikiem ryzyka mikrobiologicznego, a reakcja bioluminescencji jest bardzo wymagająca → metoda zyskała popularność ze względu na szybkość
- Marginalnie dokładne i retrospektywne kontra niedokładne i prospektywne → decyzja jest zazwyczaj podejmowana na podstawie ceny, przyzwyczajenia i wygody

Typ komórki	Ilość ATP na komórkę
Prokariotyczne (bakterie)	1 fg
Eukariotyczne (rośliny, zwierzęta i grzyby)	10,000,000 fg

$$1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$$

Metody monitorowania analitycznego ⁽⁴⁾

CytoQuant® zapewnia szybkie rezultaty w przypadku skażenia bakteryjnego
» skoncentrowane i skuteczne działanie przedoperacyjne

	Metody hodowlane	ATP	CytoQuant®
Ocena ryzyka mikrobiologicznego	++	–+	++
Czas oczekiwania na wynik	--	++	++
Odporność metody	+-	--	++
Ocena zarówno czyszczenia, jak i dezynfekcji	--	--	++
Prostota przepływu pracy	--	++	++
Testowanie w punkcie potrzeby	--	+-	++

Jak wdrożyć ⁽¹⁾

Plan pobierania próbek i wartości graniczne (progi) ustalane są na podstawie oceny ryzyka

- Sygnał EMP jest specyficzny dla środowiska przetwarzania i dlatego nie można go przenosić między obiektami
- Powszechnie brane pod uwagę czynniki ryzyka:
 - ✓ prawdopodobieństwo skażenia (etap przetwarzania, bliskość produktu)
 - ✓ trudności w dezynfekcji

		Trudności w dezynfekcji		
		Wysoki	Średni	Niski
Prawdopodobieństwo skażenia	Wysoki			
	Średni			
	Niski			

Jak wdrożyć ⁽²⁾

Wartości graniczne są specyficzne dla danego miejsca i należy je ustalić, a nie przyjąć, niezależnie od zastosowanej metody

- Istnieją wartości wskaźnikowe zarówno dla testów mikrobiologicznych, jak i testów ATP → dokładna inspekcja ujawnia, że wartości te rzadko mają zastosowanie, szczególnie w przypadku testów ATP
- Rzeczywiste wartości graniczne należy ustalić, wykonując analizę trendów i porównując je z innymi danymi monitorującymi (np. higieną produktu, innymi danymi EMP).
- Dzięki ciągłemu doskonaleniu wartości początkowe można dostosowywać w każdym cyklu weryfikacji, aby odzwierciedlały rzeczywistość konkretnego środowiska przetwarzania



Jak wdrożyć ⁽³⁾

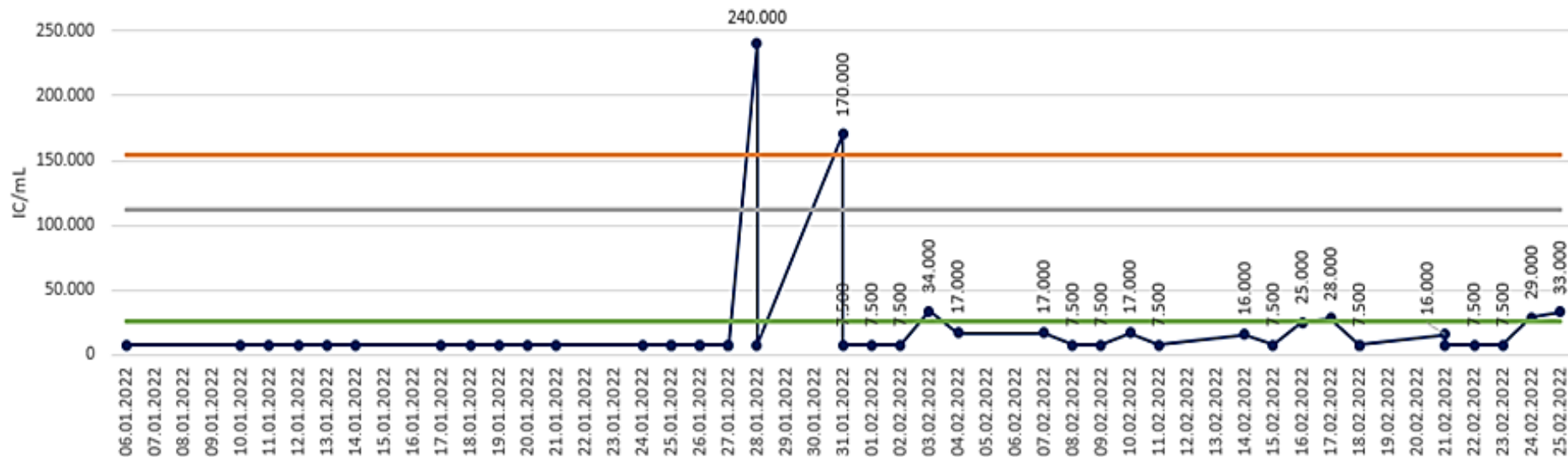
Ustal wartości graniczne na podstawie analizy trendów (min. 10 osobnych pomiarów na punkt poboru próbek) i rozpocznij monitorowanie stanu sanitarnego za pomocą wykresu kontroli procesu.

Nieuszkodzone komórki / mL

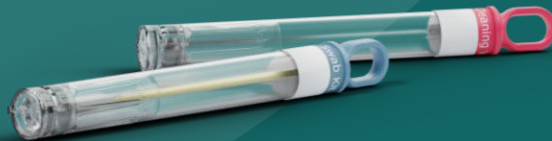


Jak wdrożyć ⁽⁴⁾

Dane dotyczące powierzchni mającej kontakt z żywnością poddanej obróbce w zakładzie produkującym mięso gotowe do spożycia (Niemcy)

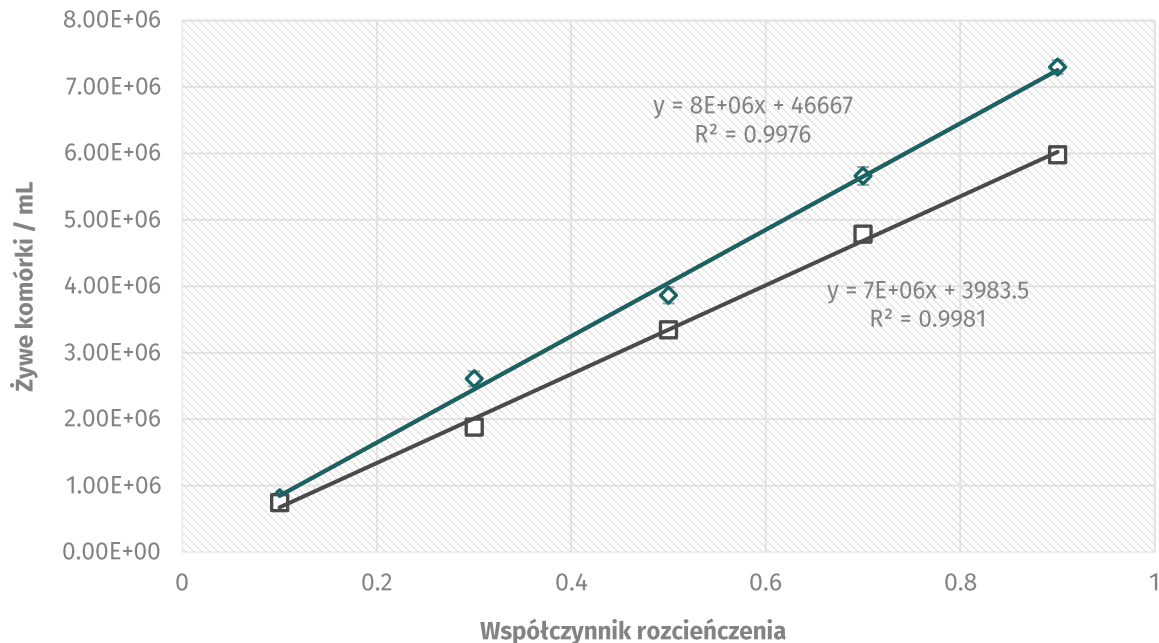


Monitorowanie kultur starterowych i probiotyków za pomocą **CytoQuant®**



Kultury startowe i probiotyki

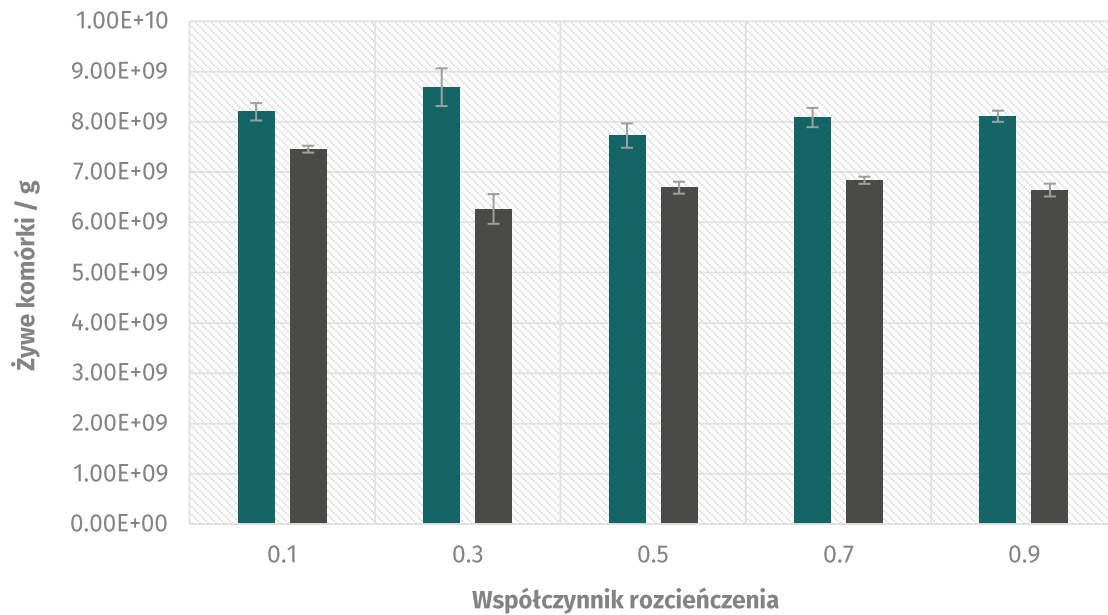
Dane dotyczące komercyjnego probiotyku do żywienia zwierząt stosowanego w akwakulturze



- Liniowość wyników w funkcji ułamka rozcieńczenia dla CytoQuant® (linia górna) i CytoFLEX (linia dolna).
- DiBAC4(3) został użyty do barwienia żywych komórek w cytometrii przepływowej FCM.

Kultury startowe i probiotyki

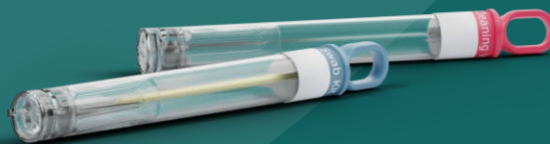
Dane dotyczące komercyjnego probiotyku do żywienia zwierząt stosowanego w akwakulturze



- Liczba żywych bakterii na gram produktu probiotycznego obliczona na podstawie pomiaru każdego współczynnika rozcieńczenia – wartości średnie obejmujące odchylenie standardowe powtórzeń (kolumny lewe przedstawiają wyniki CytoQuant®).



Monitorowanie wód procesowych za pomocą **CytoQuant®**

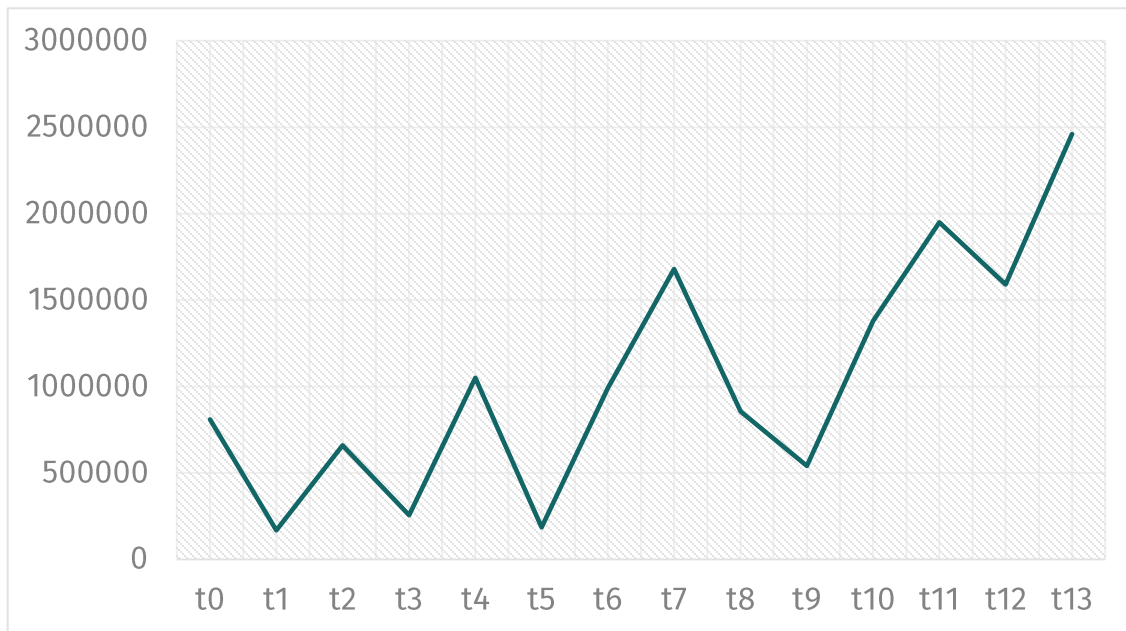


Making the World's Food Safer



Wody procesowe

Dane dotyczące wody do płukania z linii RTE (ready-to-eat) dla młodego szpinaku (Niemcy)



- Liczba komórek z nieuszkodzoną błoną (IC) wzrastała w trakcie produkcji, ponieważ gromadząca się materia organiczna obniżała skuteczność środka dezynfekcyjnego.
- Jako środek dezynfekcyjny stosowano dwutlenek chloru w stężeniu do 3 mg/L.

Making the World's Food Safer

For more information visit
www.romerlabs.com