

KA 2340/1-5 Stanovení počtu vybraných patogenních a indikátorových mikroorganismů v potravinách pomocí automatizované metody TEMPO®

1. Princip metody

TEMPO je automatizovaný test založený na enzymatickém principu. Je určen pro přímé stanovení počtu vybraných mikroorganismů v potravinách. Výsledek je získán na principu **metody nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN, Most Probable Number)**. MPN metoda patří mezi základní techniky stanovení počtu mikroorganismů při použití tekutých pūd. Je založena na pravděpodobnosti záchytu mikroorganismů ze vzorku. Nejvýše pravděpodobný počet se zjistí v tabulkách, kde jsou statisticky vypočteny nejpravděpodobnější hodnoty odpovídající počtu záchytů, tj. počtu pozitivních zkumavek ve třech po sobě jdoucích sériích ředění vzorku, pro daný počet očkovaných zkumavek v každé sérii.

Pro vlastní provedení metody se využívá **TEMPO kit** (obr. 1), jenž se skládá ze **2 částí**. První část představuje **vialka s kultivačním médiem**, do které se přidává přímo testovaný vzorek (homogenát vyšetřované potraviny – ředění 10^{-1}). Vlastní kultivační medium je nezbytné před inokulací vzorku resuspendovat v destilované vodě. Pomocí této resuspendace lze upravit i výsledné ředění (1/40; 1/400 atd.).

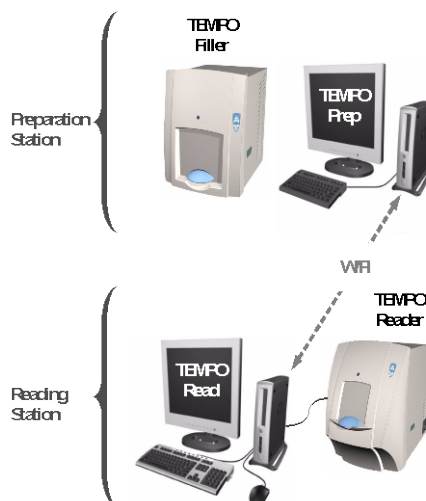
Druhou část tvoří **specifická karta**. Kultivační médium je po naočkování testovaným vzorkem automaticky přeneseno do karty, která obsahuje 3 sady jamek po 16, s jedním logaritmem rozdílu v objemu každé sady.



Obr. 1 TEMPO kit (karta a vialka)

Vialka i karta jsou opatřeny unikátním **čárovým kódem**, který slouží k přesné identifikaci jednotlivých vzorků a vylučuje jejich záměnu. Součástí systému jsou 2 přístroje: **plnička (FILLER)**, ve které dochází k naplnění karet směsí ve vialce a **čtečka (READER)**, ve které dochází k odečtu výsledků. Součástí obou přístrojů jsou počítače vybaveny specifickým softwarem. Oba přístroje jsou vzájemně propojeny pomocí bezdrátové sítě a dochází mezi nimi k automatickému přenosu dat.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obr. 2 TEMPO system

Mikroorganismy, jsou-li ve vzorku přítomny, metabolizují v kartě v průběhu kultivace živiny z kultivačního média, což způsobí pokles pH a vymizení fluorescenčního signálu vyzařovaného **4-methylumbeliferonem (4MU)**. Signál je snímačem TEMPO detekován díky fluorescenčnímu indikátoru pH pouze tehdy, je-li pH neutrální. V závislosti na počtu pozitivních jamek vypočítá systém TEMPO počet mikroorganismů ve vzorku metodou MPN.

Druhá možnost detekce je založena na specifické enzymatické aktivitě hledané bakterie. Při tomto způsobu dochází k enzymatickému odštěpení látky z vazby na 4MU, jenž se stává fluorescentní. Pozitivní jsou v tomto případě jamky vyzařující fluorescenční signál.

Na základě počtu pozitivních zkumavek v každé řadě, získáme stejně jak u klasické metody MPN **trojciferný kód**. Tento kód je pak přístrojem automaticky vyhodnocen. **Výsledek** je uveden přímo v **cfu/g** potraviny s již zohledněným ředěním

2. Popis metody

Automatizovanou metodu TEMPO® lze využít pro vyšetření celé řady mikroorganismů zahrnujících jak patogenní, tak indikátorové a technologicky významné mikroorganismy. Konkrétně byly zatím vyvinuty kity pro stanovení CPM, koliformních MO, *E. coli*, kvasinek a plísní, bakterií mléčného kvašení a koaguláza pozitivních stafylokoků. Každým rokem se toto nabízené spektrum stanovení dále rozšiřuje.

Velkou výhodou této metody je jednoduchost, možnost provedení více než 500 vyšetření během jednoho dne a plná automatizace metody, při které odpadá možná chyba lidského faktoru při počítání kolonií.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

3. Pracovní postup

1. Do sterilního homogenizačního sáčku odvážíme 10 g (resp. 25 g) testované potraviny a přidáme 90 ml (resp. 225 ml) **pufrované peptonové vody (PPV)**. Vzorek homogenizujeme ve stomacheru a získáme výchozí – tzv. **primární ředění vzorku 10^{-1}** .
2. Do vialky, která je součástí TEMPO kitu, přidáme **sterilní destilovanou vodu** v takovém množství, abychom získali požadované finální ředění. Pomocí destilované vody dojde k důkladné resuspendaci lyofilizovaného kultivačního média obsaženého ve vialce. **Základní finální ředění je 1/40 resp. 1/400**. Finální ředění volíme na základě předpokládané kontaminace vzorku, neboť se dle ředění liší rozpětí možného záchytu hledaných mikroorganismů. Při požadovaném ředění 1/40 přidáme do vialky 3 ml sterilní destilované vody. Při požadovaném ředění 1/400 přidáme do vialky 3,9 ml sterilní destilované vody (tab. 1). Důkladně promícháme na vortexu.
3. Asepticky napipetujeme 1 ml (v případě finálního ředění 1/40) nebo 0,1 ml (v případě finálního ředění 1/400) zhomogenizovaného vzorku (primární ředění 10^{-1}) do vialky (tab. 1). Důkladně promícháme na vortexu.

Tab. 1 Příprava finálního ředění

Finální ředění	Množství destilované vody	Množství vzorku (10^{-1})	Rozpětí záchytu
1/40	3 ml	1 ml	10 to 49 000 cfu/g
1/400	3,9 ml	0,1 ml	100 to 49 0000 cfu/g

4. Následuje načtení čárového kódu vialky a dále načtení zatím prázdné karty pomocí čtečky čárových kódů, jež je součástí systému TEMPO. Po zanesení údajů do systému a jejich zobrazení na počítači, který je součástí plničky, lze tyto doplnit i vlastním názvem vzorku a především uvedením použitého ředění (1/40 nebo 1/400, případně další vyšší).
5. Karta i vialka se umístí do speciálního stojánku tak, aby karta byla ponořena nasávací trubičkou do vialky. Stojánek se následně umístí do plničky (Filler) a vzorek je automaticky nasán z vialky do karty, nasávací trubička je přetřata a zatavena, což vylučuje možnost případné další kontaminace. Zde je potřeba provést i vizuální kontrolu, zda opravdu došlo k nasátí vzorku do karty.
6. Po naplnění dáme karty inkubovat (v inkubačním stojánku) na požadovanou dobu a teplotu, dle stanovovaného agens.
7. Po inkubaci přeneseme karty do čtečky (reader), kde během několika málo minut dojde k odečtení a vyhodnocení výsledku. Výsledek je zobrazen v počítači (součást čtečky) v přehledné tabulce přímo v cfu/g potraviny se zohledněným ředěním. Přístroj umožňuje i přímé vytištění výsledků nebo jejich transport do uživatelského PC.