



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

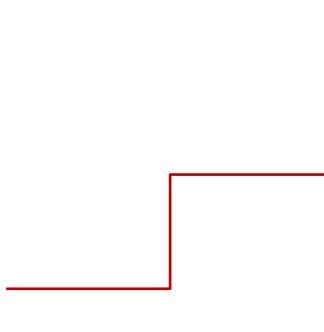
ΤΑΧΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ



ΤΑΧΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Είναι σε συνεχή άνοδο !

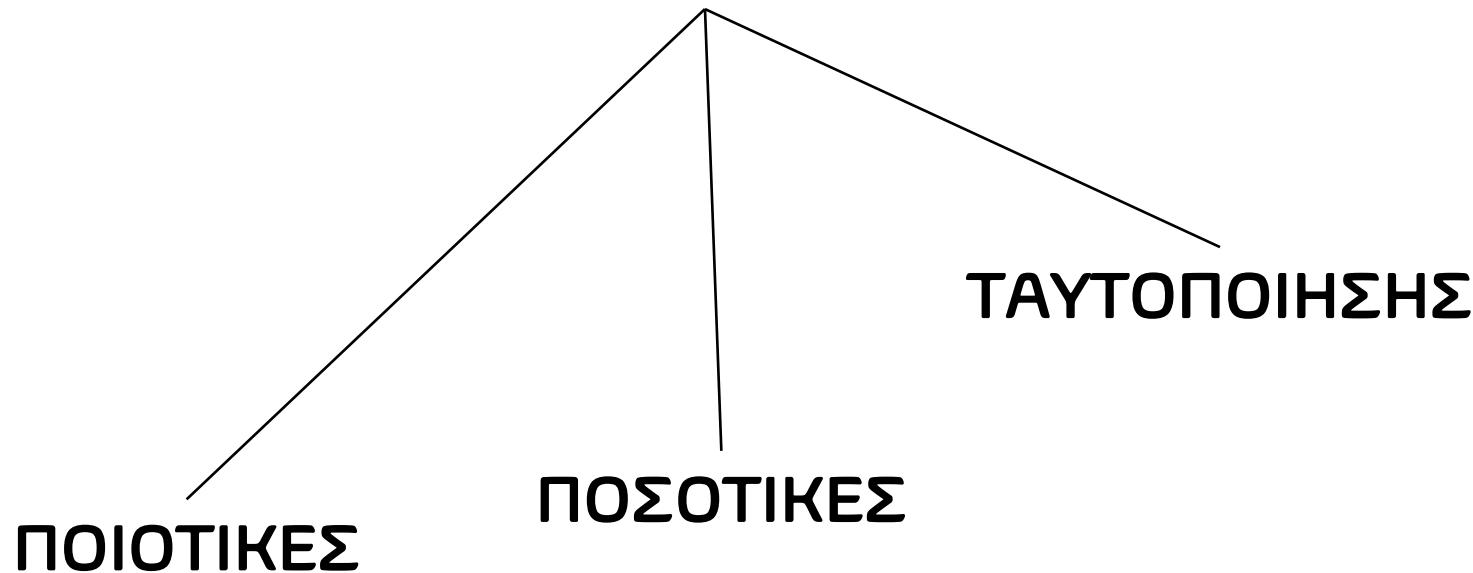
- 1) Αφορούν ένα τεράστιο χώρο !
- 2) Επέκταση των Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας
- 3) Ήπια επεξεργασμένα τρόφιμα
- 4) Πολύ μεγάλοι παραγόμενοι όγκοι α' υλών και τροφίμων
- 5) Πολλά «ταχυκίνητα» προϊόντα



- Υγεία
- Τρόφιμα
- Καλλυντικά
- Συμπληρώματα διατροφής
- Ζωτροφές

ΤΑΧΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ



ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΚΡΙΣΙΜΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

**ΠΟΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΛΥΤΕΡΕΣ ?
Κλασικές ή Ενόργανες/ Ταχείες**

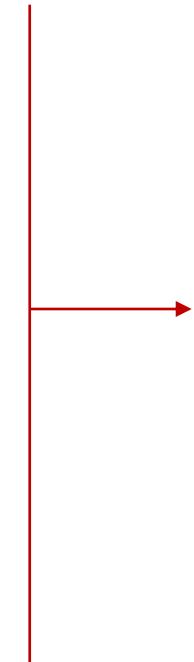
**Δεν υπάρχει «καλύτερη» !
Υπάρχει η πιο κατάλληλη κατά περίπτωση !!!**

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΚΡΙΣΙΜΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

1

Τα αποτελέσματα εξαρτώνται τελικά από την ευαισθησία της μεθόδου;

Σχεδόν πάντα οι Ταχείες Μικροβιολογικές Μέθοδοι – ΤΤΜ) βασίζονται στη βιωσιμότητα και **'ΟΧΙ** στην μικροβιακή ανάπτυξη υπό την μορφή αποικιών (cfu's).

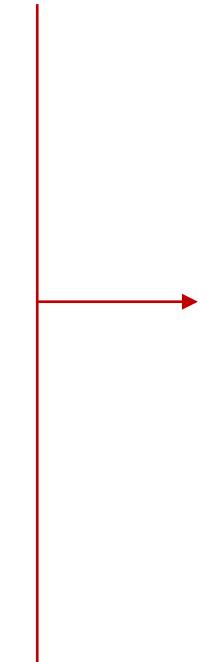


ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΚΡΙΣΙΜΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

1

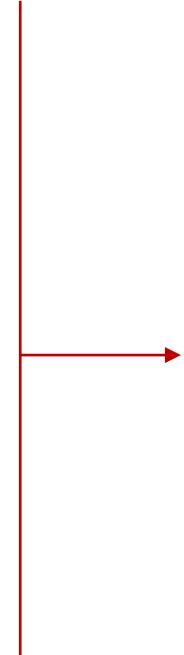
Τα αποτελέσματα εξαρτώνται τελικά από την ευαισθησία της μεθόδου;

Οι τεχνολογίες εντοπισμού ζωντανών κυττάρων και όχι αποικιών σε αρκετές περιπτώσεις ανιχνεύουν και ποσοτικοποιούν **μεγαλύτερο αριθμό βιώσιμων μικροοργανισμών σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους που βασίζονται στην ανάπτυξη κυττάρων προς το σχηματισμό αποικών.**



Αυτό μπορεί να οφείλεται στους:

- εγγενείς περιορισμούς των κλασσικών μεθόδων που βασίζονται στην ανάπτυξη κυττάρων/ αποικιών,
 - οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται αργά,
- μεταβλητότητα στην απόκρισή τους στις μεθόδους καλλιέργειας
- οι συνθήκες επώασης δεν είναι βέλτιστες για την ανάνηψη και την ανάπτυξη stressed, injured, και βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων (VBNC) κυττάρων.



- **ΥΠΑΡΧΕΙ ΖΗΤΗΜΑ** σε ότι αφορά:
- τα αποτελέσματα των κλασσικών μεθοδολογιών
- τα αποτελέσματα των εξαιρετικά ευαίσθητων ΤΜΜ
 - τα όρια που θέτει η Νομοθεσία!

Οι ΤΜΜ λόγω της αυξημένης ευαισθησίας
μπορεί να εντοπίζουν παθογόνο βακτήριο ενώ
η κλασσική όχι !!!

Το ζήτημα του
Σχήματος Δειγματοληψίας

Τί νόημα μπορεί να έχει μία ανάλυση όταν το Δείγμα
δεν είναι αντιπροσωπευτικό ;

- Είναι πολυπαραγοντικό ζήτημα





ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ/ ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ/ ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ

Αριθμός κυττάρων
Είδος/ Ομάδα κυττάρων

**ΤΑΧΕΙΕΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΜΕΘΟΔΟΙ**

ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ



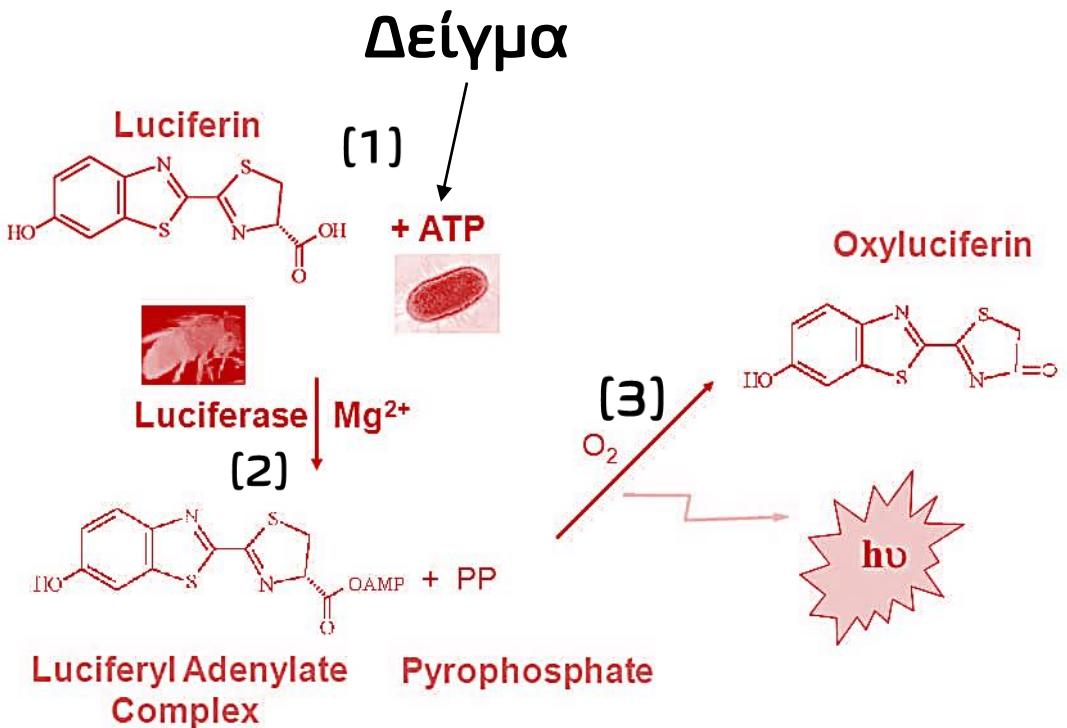
RMM	Type of determination	Detection method	Detection principle	Time to result
ATP bioluminescence	Qualitative; Quantitative	Direct analysis	Detection of bioluminescence of the reaction of ATP, present on living cells, with luciferase.	1 h 4 to 7 days for sterility test



Swab, snap, squeeze. It's that easy.

Using Hygiena ATP tests couldn't be easier. The three step process for collecting a sample, activating the device, and mixing the sample is so easy, anyone can do it.

Ο προσδιορισμός
βιοφωταύγειας ATP
λειτουργεί με την έκθεση
ενός δείγματος στο ένζυμο
λουσιφεράση και στο
υπόστρωμα λουσιφερίνη.





Ο προσδιορισμός βιοφωταύγειας ATP **υποθέτει** ότι τα **ζωντανά κύτταρα** σε ένα δείγμα έχουν **σταθερή ποσότητα ATP**.

Η αρχή της μεθόδου χρησιμοποιεί αυτή την υπόθεση μαζί με τη χημική σχέση μεταξύ ATP, λουσιφερίνης και του ενζύμου λουσιφεράσης προκειμένου να μετρήσει τα ζωντανά κύτταρα.

Με άλλα λόγια, μας επιτρέπει να μετρήσουμε την ποσότητα ζωντανών κυττάρων σε ένα δείγμα με βάση την παρουσία ή την απουσία ATP η οποία αντιστοιχίζεται σε ένταση εκπομπής ακτινοβολίας

ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

1

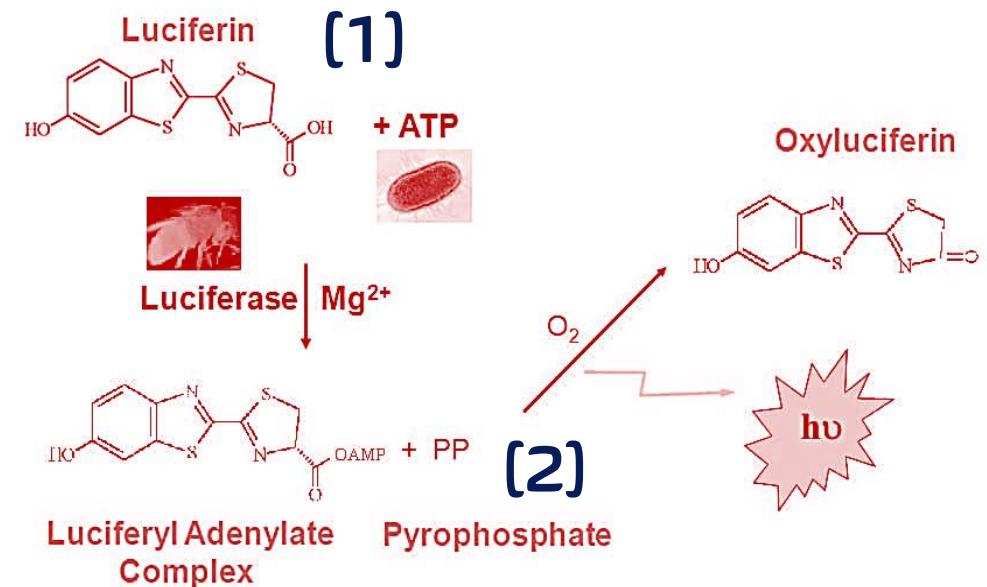
Υπάρχουν δύο στάδια στην αντίδραση της λουσιφεράσης.

- Το πρώτο βήμα είναι η αδενυλίωση της λουσιφερίνης που χρησιμοποιεί ATP.

- Το δεύτερο βήμα είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του αδενυλικού λουσιφερυλεστέρα προς

σχηματισμό οξυλουσιφερίνης. Η σχηματιζόμενη οξυλουσιφερίνη βρίσκεται σε διεγερμένη

κατάσταση και το **φως** παράγεται όταν επιστρέφει στη βασική κατάσταση



ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

1

Η ποσότητα του φωτός βιοφωταύγειας μετριέται με το «ΙΛΟΥΜΙΝΟΜΕΤΡΟ» και εκφράζεται σε **Μονάδες Σχετικού Φωτός (RLU)**.

Οι αριθμοί **RLU** είναι ευθέως ανάλογοι με την **ποσότητα του ATP**, και επομένως την **ποσότητα των οργανικών υπολειμμάτων/τροφίμων** ή της μικροβιακής βιομάζας στην επιφάνεια του δείγματος.



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Απλό στην εκτέλεση
- Εξαιρετικά ευαίσθητο
- Οικονομικό
- Μεγάλος αριθμός δειγμάτων που «τρέχουν» ταυτόχρονα
- Ταχύτερη από τις συμβατικές μεθόδους

ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ !!

- Δεν διακρίνει το ATP από τους μικροοργανισμούς, τα ζώα και τα φυτά.
- Η φωταύγεια από τα τρόφιμα μπορεί να επηρεάσει τις πραγματικές μετρήσεις βιοφωταύγειας ATP.
- Η παρουσία απορρυπαντικών, απολυμαντικών ή άλλων χημικών ουσιών μπορεί επίσης να επηρεάσει τις μετρήσεις.
- Δεν υποκαθιστά τη χρήση της παραδοσιακής μικροβιολογικής ανάλυσης.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Ανίχνευση μικροβιακού φορτίου στο νωπό γάλα (cfu/ml).
- Αξιολόγηση μικροβιολογικής ποιότητας νωπών κρεάτων
- Παρακολούθηση της μικροβιολογικής δραστηριότητας σε εσωτερικό αέρα (cfu/ml).
- Παρακολούθηση της ποιότητας του νερού.

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ
ΕΡΜΗΝΕΙΑ
ΤΩΝ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ !!**



ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ

Η δοκιμασία βιοφωταύγειας ATP είναι ίσως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη βιομηχανία τροφίμων για την παρακολούθηση της υγιεινής και την επικύρωση καθαρισμού **ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ**.

Δημιουργήθηκε κυρίως για την επικύρωση του καθαρισμού.

2 KYΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ





ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

RMM	Type of determination	Detection method	Detection principle	Time to result
Flow cytometry	Qualitative Quantitative	Direct analysis	Detection of fluorophore-marked bacteria on a flow cytometer.	Few minutes



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Αρχή λειτουργίας

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία που βασίζεται σε **λέιζερ** που χρησιμοποιείται για την **ανίχνευση** και τη **μέτρηση** φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών **κυττάρων** ή σωματιδίων σε ένα ετερογενές υγρό μίγμα.

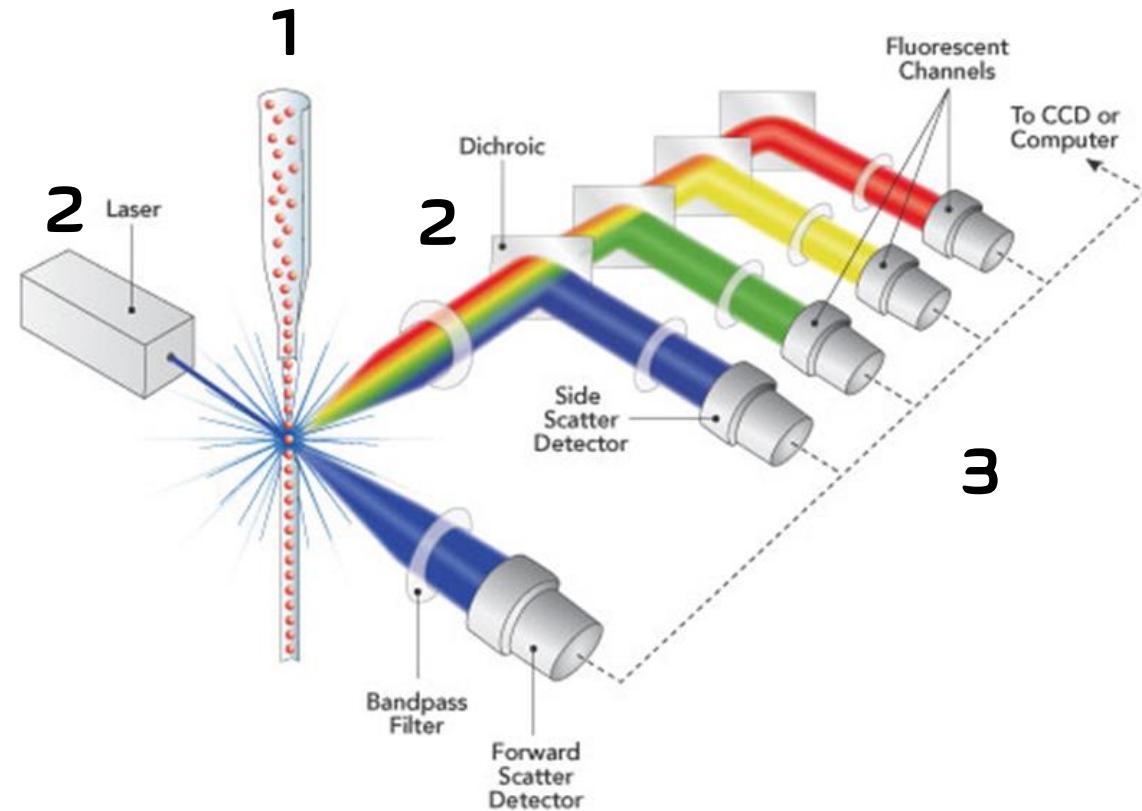


ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ένα κυτταρόμετρο ροής αποτελείται από τρία κύρια συστήματα:

- 1/ Σύστημα Κινητής Φάσης,
- 2/ Οπτικό σύστημα και
- 3/ Ηλεκτρονικό σύστημα.

Αρχή λειτουργίας

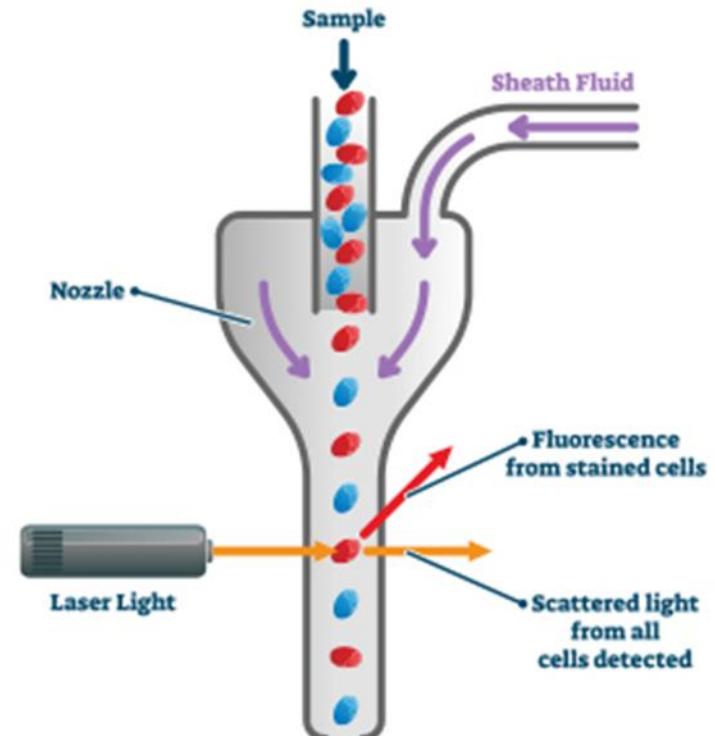


ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Σύστημα Κινητής Φάσης

Ο σκοπός του συστήματος **Κινητής Φάσης** είναι να μεταφέρει σωματίδια σε ένα ρεύμα ρευστού – μέσω τριχοειδούς σωλήνα – στην δέσμη λέιζερ.

FLOW CYTOMETRY

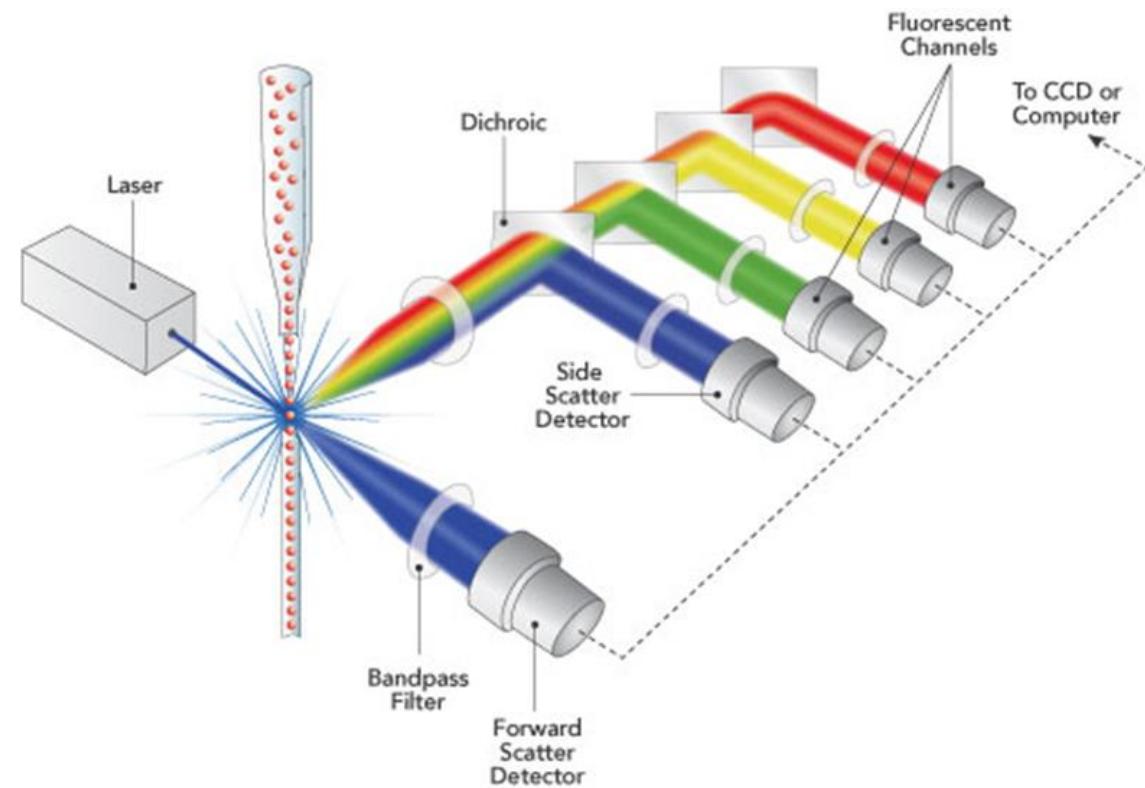


ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Οπτικό Σύστημα

Το Οπτικό Σύστημα του κυτταρομέτρου αποτελείται από το Σύστημα Διέγερσης και το Σύστημα Συλλογής.

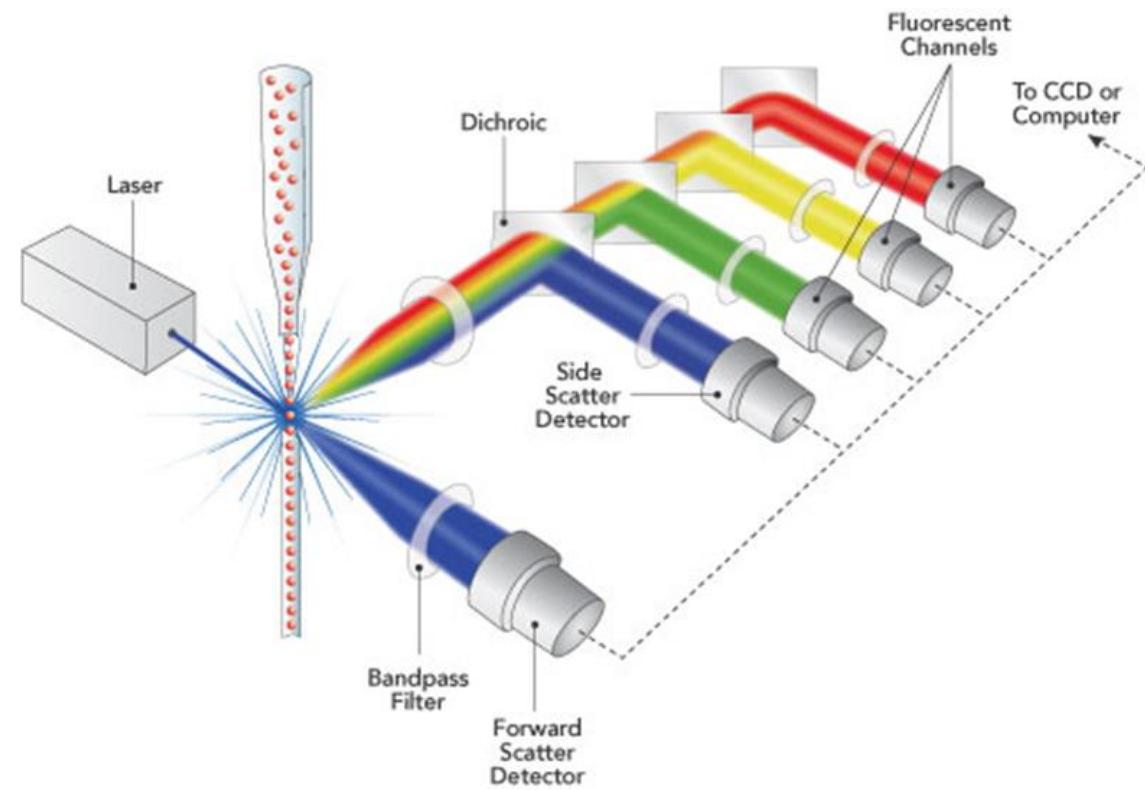
Το Οπτικό Σύστημα Διέγερσης αποτελείται από το λέιζερ και τους φακούς που χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση και εστίαση της δέσμης λέιζερ στη ροή του δείγματος.



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Οπτικό Σύστημα

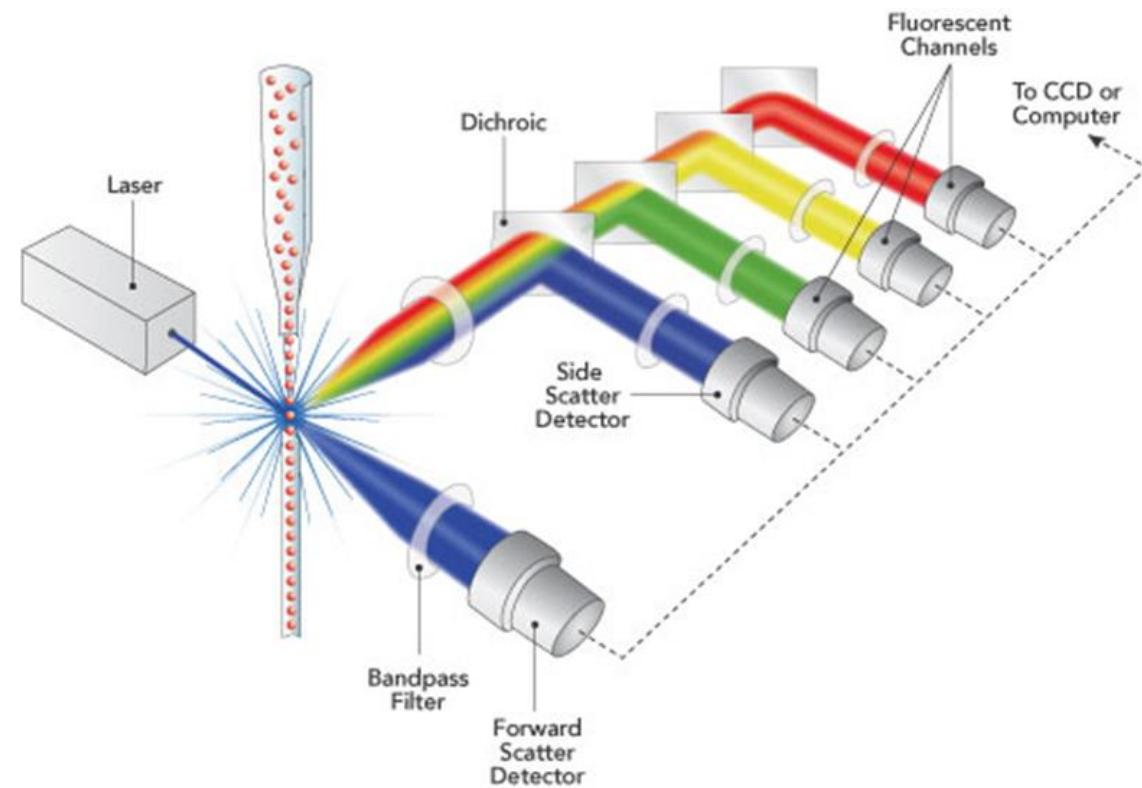
Το Οπτικό Σύστημα Συλλογής αποτελείται από έναν φακό συλλογής για το φως που εκπέμπεται μετά την αλληλεπίδραση του σωματιδίου με τη δέσμη λέιζερ και ένα σύστημα οπτικών κατόπτρων που εκτρέπουν τα καθορισμένα μήκη κύματος του συλλεγόμενου φωτός σε καθορισμένους οπτικούς ανιχνευτές.



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Οπτικό Σύστημα

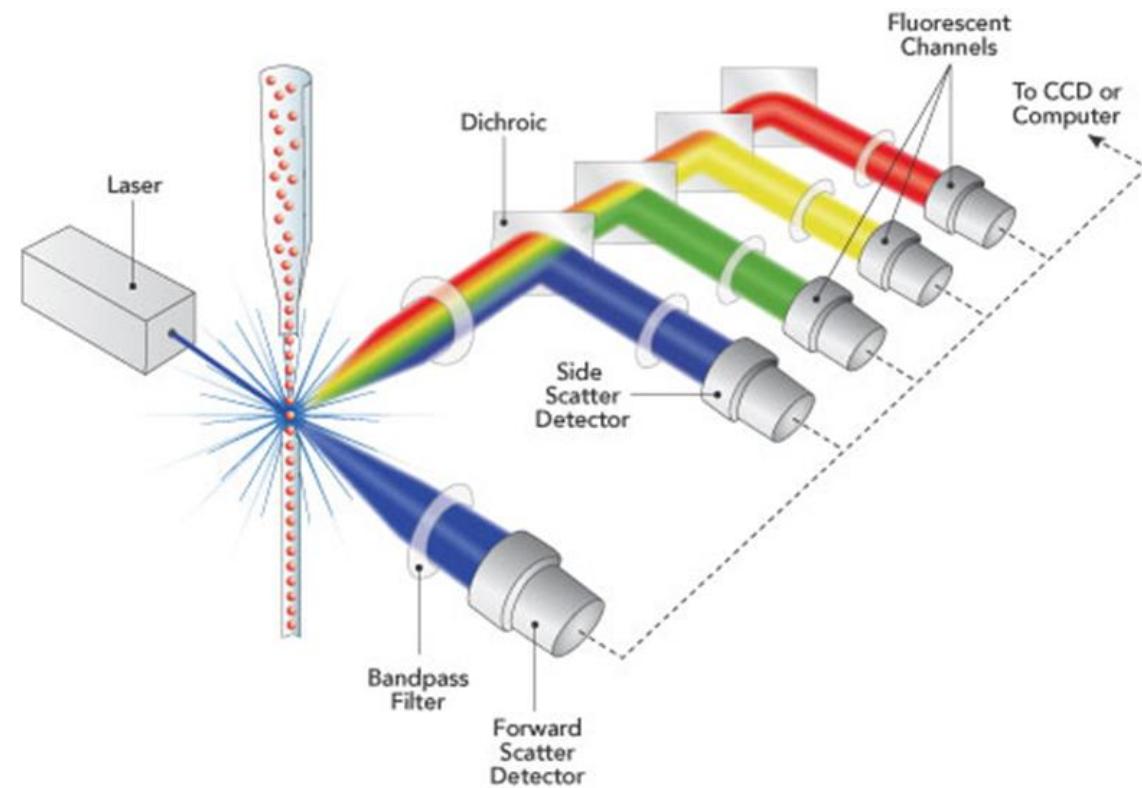
Όταν ένα κύτταρο ή σωματίδιο περάσει μέσα από το φως του λέιζερ, οι ακτίνες που εκπέμπονται στο πλάι και τα **σήματα φθορισμού** κατευθύνονται στους σωλήνες φωτοπολλασιαστή (PMTs) και μια φωτοδίοδος συλλέγει τα σήματα.



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Οπτικό Σύστημα

Για να επιτευχθεί η εξειδίκευση ενός ανιχνευτή για μια συγκεκριμένη φθορίζουσα βαφή, τοποθετείται ένα φίλτρο μπροστά από τους σωλήνες, το οποίο επιτρέπει μόνο σε ένα στενό εύρος μηκών κύματος να φτάσει στον ανιχνευτή.



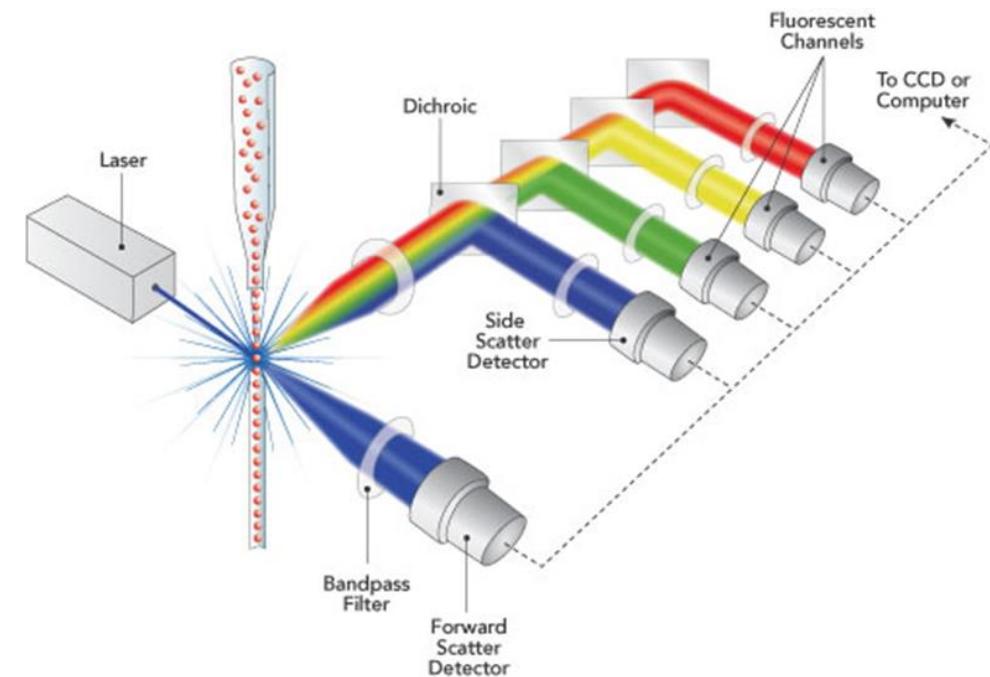
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ηλεκτρονικό Σύστημα

Το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει τα σήματα από τους ανιχνευτές σε ψηφιακά σήματα που μπορούν να διαβαστούν από έναν υπολογιστή.

Μόλις τα φωτεινά σήματα χτυπήσουν τη μία πλευρά του PMT ή της φωτοδιόδου, μετατρέπονται σε σχετικό αριθμό ηλεκτρονίων που πολλαπλασιάζονται για να δημιουργήσουν ένα πιο σημαντικό ηλεκτρικό ρεύμα.

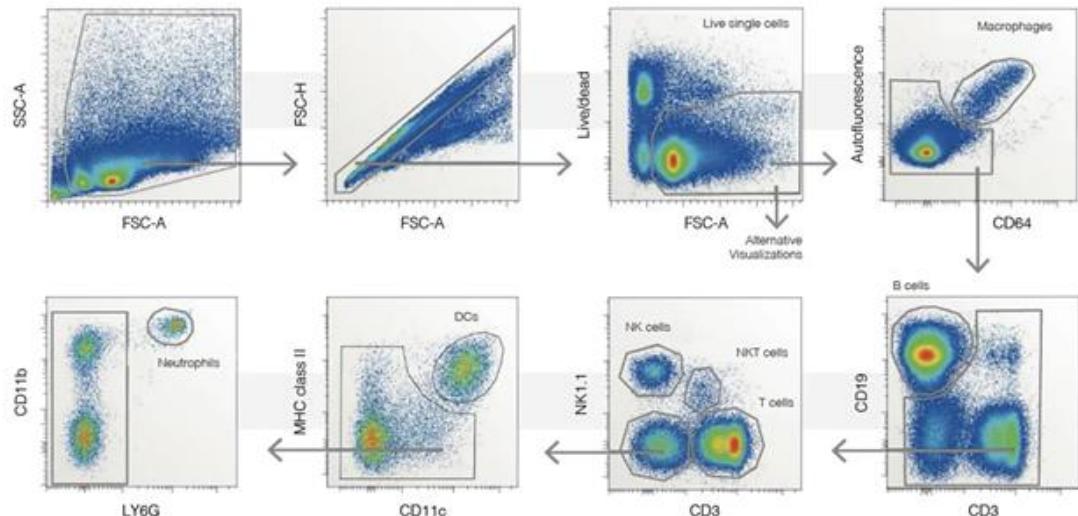
Το ηλεκτρικό ρεύμα μετακινείται στον ενισχυτή και μετατρέπεται σε παλμό τάσης.



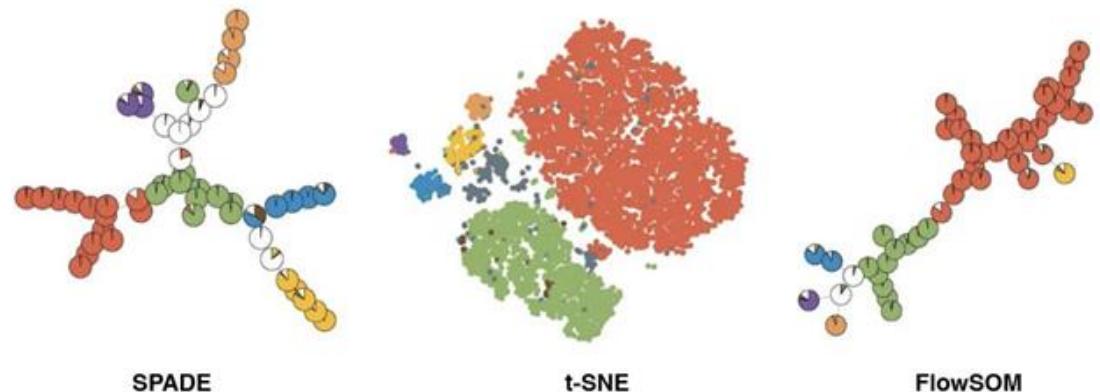
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

a Manual Gating



b Mapping of the manual gating



- Unknown
- Macropha



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Ταχύτατη στην εκτέλεσή της
- Εξαιρετικά ακριβής
- Εξαιρετικά εξειδικευμένη

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Η προεπεξεργασία που σχετίζεται με την προετοιμασία του δείγματος και τη χρώση είναι μια χρονοβόρα διαδικασία.
- Η κυτταρομετρία ροής είναι μια δαπανηρή διαδικασία που απαιτεί υψηλά καταρτισμένους τεχνικούς.

3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ



3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

Αρχή λειτουργίας

Μοιάζει με την Κυτταρομετρία ροής.

Βασίζεται στη βιωσιμότητα (*viability*) των βακτηρίων και χρησιμοποιεί παρόμοια μέθοδο χρώσης και διέγερσης με λέιζερ όπως και η κυτταρομετρία ροής..... αντίστροφα όμως !

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

Αρχή λειτουργίας

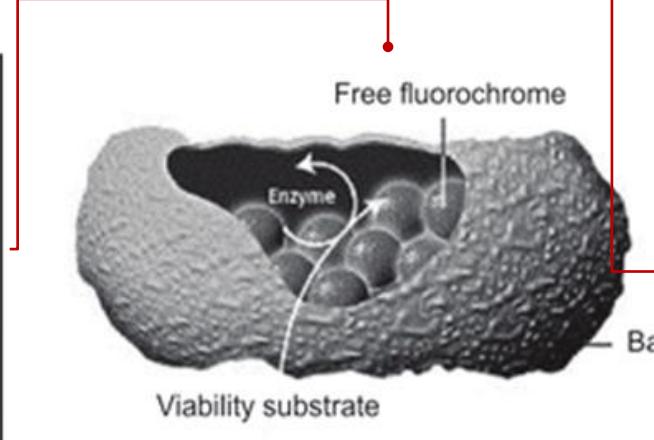
1 Τα δείγματα δοκιμής διέρχονται αρχικά από ένα φίλτρο μεμβράνης 0,4 μπ και στη συνέχεια η μεμβράνη εκτίθεται σε μία μη φθορίζουσα ένωση.

2 Οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που συγκρατούνται στο φίλτρο απορροφούν τη μη-φθορίζουσα ένωση στο κυτταρόπλασμα τους ή οποία διασπάται ενζυματικά από μια ενδοκυτταρική εστεράση.

3 Αυτή η ενζυματική διάσπαση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μίας εν δυνάμει φθορίζουσας ένωσης, η οποία μπορεί να διεγερθεί όταν εκτεθεί σε λέιζερ κατάλληλου μήκους κύματος.

4 Οι μικροοργανισμοί που έχουν άθικτη κυτταρική μεμβράνη, φθορίζουν και καταμετρώνται καθώς η μεμβράνη σαρώνεται από το λέιζερ.

2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

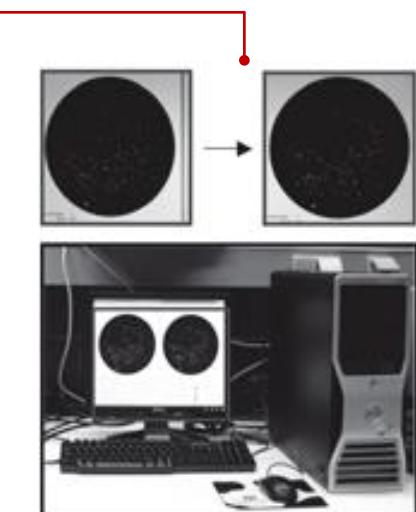


1 filtration

2 labelling



3 scanning



4 data analysis by computer

2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Απαιτεί χρόνο η προκατεργασία του δείγματος
-

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

- ΔΕΝ απαιτεί χρόνο η προκατεργασίας του δείγματος
- Μικρότερος «θόρυβος»

2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

Μειονέκτημα
(σοβαρό)

Να φιλτράρονται τα
δείγματα !

ΤΕΛΙΚΑ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΣΚΟΠΙΜΟ ΝΑ
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ Η ΜΕΘΟΔΟΣ ?

2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

Ποιοτική και
Ποσοτική εκτίμηση
μικροοργανισμών
ΚΥΡΙΩΣ ΣΕ ΝΕΡΟ !



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ

*Ποιοτική και
Ποσοτική
εκτίμηση
μικροοργανισμών*
ΚΥΡΙΩΣ ΣΕ ΝΕΡΟ !

- Το νερό έχει ευρύτατη χρήση στην βιομηχανία τροφίμων
- Επίσης υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι σε νερό είναι σε πολύ χαμηλό αριθμό και δύσκολα αναπτύσσονται με τις κλασσικές μεθόδους

ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CO₂



ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CO₂

Αρχή λειτουργίας

Οι μικροοργανισμοί στα κατάλληλα υποστρώματα παράγουν CO₂.

Συνεπώς η παρουσία ή μη καθώς και η συγκέντρωση αυτού του κομβικού μεταβολίτη είναι απόδειξη ενεργού/ζωντανού μικροοργανισμού.

ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CO₂

Αρχή λειτουργίας

Ένα τυπικό σύστημα αυτού του τύπου αποτελείται από μία μονάδα ελεγκτή και μία μονάδα επωαστήρα με δυνατότητα ταυτόχρονης επώασης και ανίχνευσης μόλυνσης πολλών δεκαδών δειγμάτων (έως 240).

Αναλώσιμα: Φιαλίδια ειδικής κατασκευής

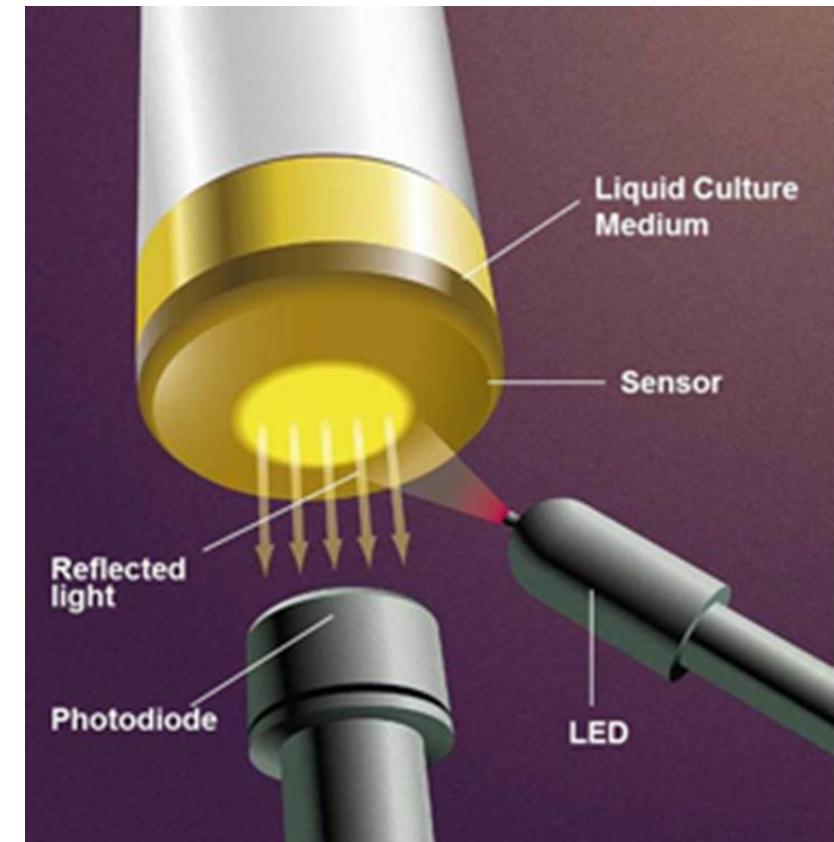


ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CO₂

Κάθε φιαλίδιο περιέχει αποστειρωμένο μέσο καλλιέργειας και είναι ενσωματωμένο με χρωματομετρικό αισθητήρα που αλλάζει από γκρι σε κίτρινο παρουσία CO₂ που παράγεται από αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς.



Αισθητήρας



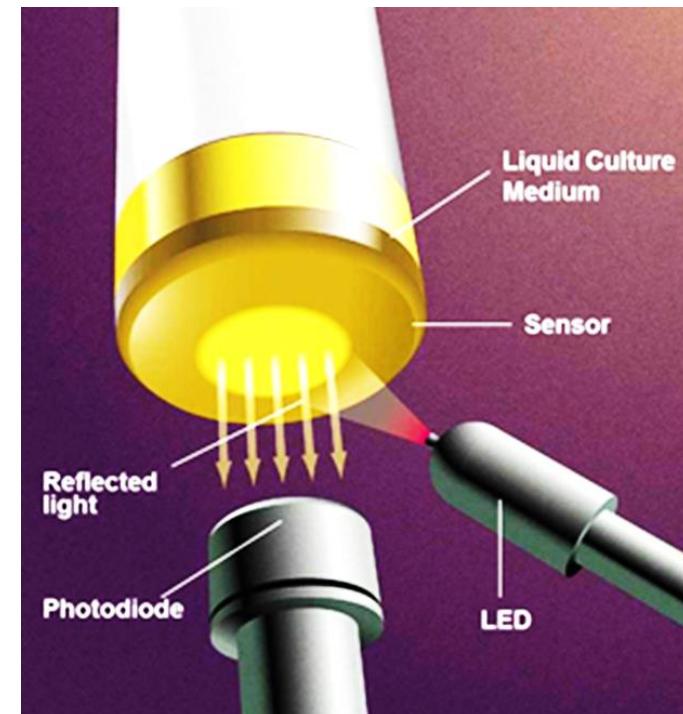
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CO₂

Ένας αισθητήρας CO₂ είναι συνδεδεμένος κάτω από κάθε φιαλίδιο ο οποίος διαχωρίζεται από το μέσο από ημιπερατή μεμβράνη.

Η μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα ιόντα, συμπεριλαμβανομένων των ιόντων υδρογόνου, σχεδόν αδιαπέραστο από το νερό αλλά είναι **ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟ** CO₂. Το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από τους αναπτυσσόμενους οργανισμούς διαχέεται κατά μήκος της μεμβράνης στον αισθητήρα και διαλύεται στο νερό, δημιουργώντας έτσι ιόντα υδρογόνου σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:



Αρχή λειτουργίας

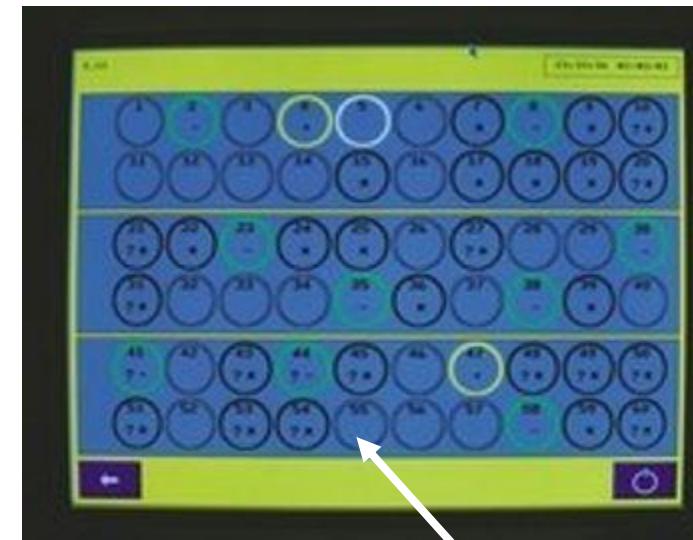


Πτώση pH
Αλλαγή χρώματος

ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CO₂

Εφαρμογές

- Απλή, τυποποιημένη ροή εργασίας
- Μειωμένο κόστος χρήσης και εργασίας.
- Μειωμένο κόστος τήρησης αποθέματος.
- Αντικειμενικά αποτελέσματα για ομοιόμορφα παχύρρευστα/θολά δείγματα
- Ισχυρή ανίχνευση βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μούχλας
- Μη καταστροφική μέθοδος.
- Δύο θερμοκρασία επώασης (32,5°C και 22,5°C).
- Συμβατό με τρόφιμα και ποτά με χαμηλή και υψηλή οξύτητα





ΜΙΚΡΟ-ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ

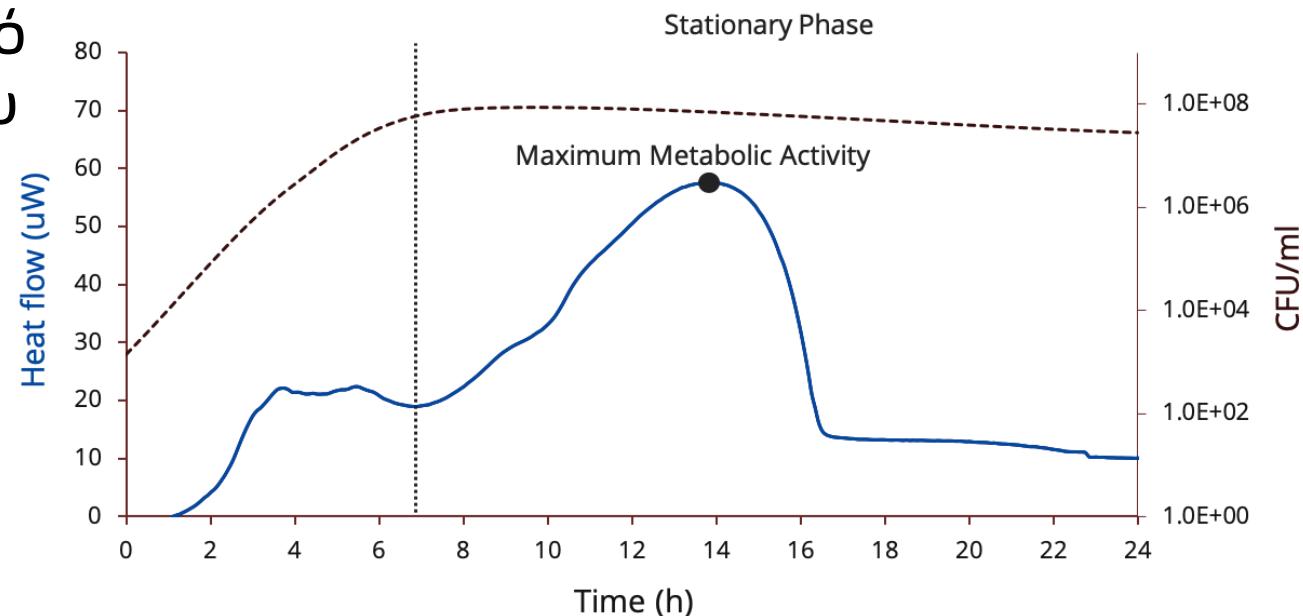




ΜΙΚΡΟ-ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ

Αρχή λειτουργίας

Η μικροθερμιδομετρία
μετρά την ενέργεια υπό
μορφή **Θερμότητας** που
παράγεται από
μεταβολικές
αντιδράσεις.
Διαφορετικοί
οργανισμοί παράγουν
διαφορετικά επίπεδα
ενέργειας κατά την
ανάπτυξή τους.

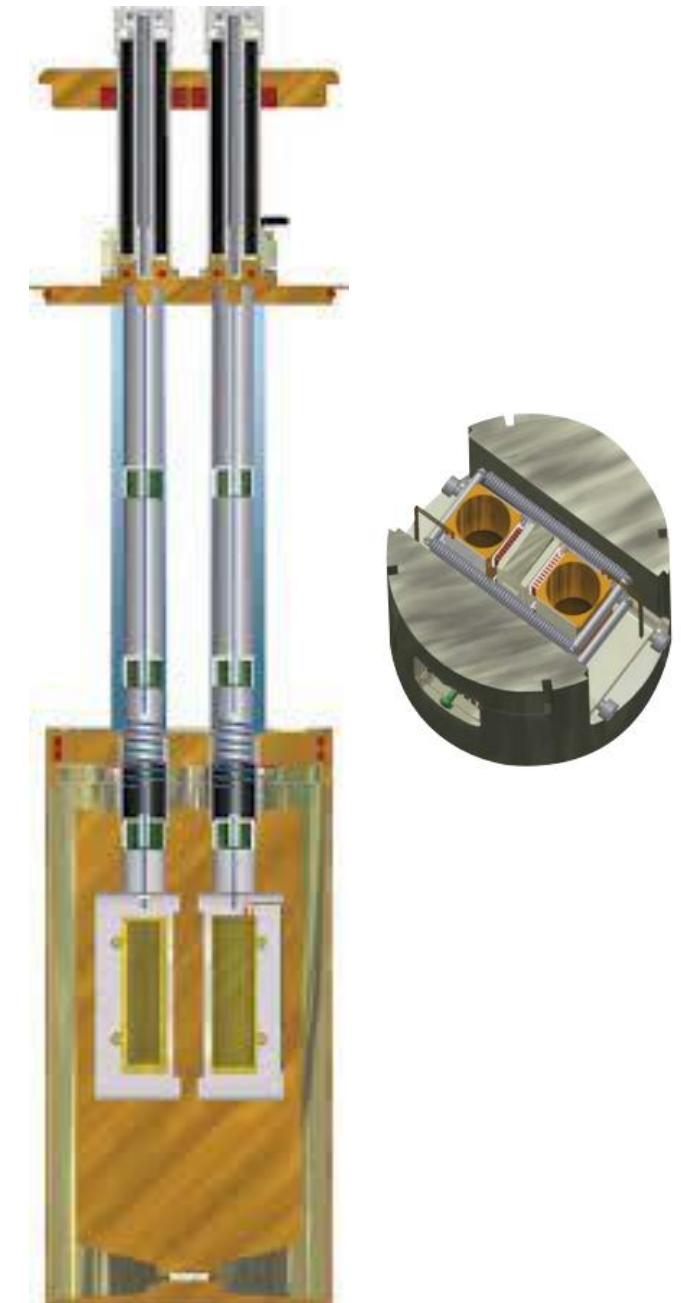




ΜΙΚΡΟ-ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ

Το δείγμα φορτώνεται σε μια κλειστή αμπούλα σε έναν επακριβώς ελεγχόμενο ισοθερμικό θάλαμο σε σταθερή θερμοκρασία (T). Η θερμότητα που ανταλλάσσεται (dQ/dt) μεταξύ του δείγματος και του περιβάλλοντος λόγω αλλαγών στην κατάσταση του δείγματος μετράται και ονομάζεται θερμική ισχύς P .

Το P καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου έναντι μιας αναφοράς που δεν αντιδρά.





ΜΙΚΡΟ-ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ

Ευαισθησία

Έχει αυξημένη ευαισθησία διότι μετρά εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα παραγωγής θερμότητας και ανιχνεύει ακόμη και την παραμικρή αλλαγή στη μεταβολική δραστηριότητα βακτηρίων.





ΜΙΚΡΟ-ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ

ΑΥΘΕΝΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Μέσα στην αμπούλα τοποθετείται **αυτούσιο** το δείγμα – στο φυσικό του περιβάλλον – με αποτέλεσμα να προσεγγίζονται απόλυτα οι πραγματικές συνθήκες – πάστα τομάτας, τρόφιμα σε σκόνη, μαγιονέζα, κ.α.

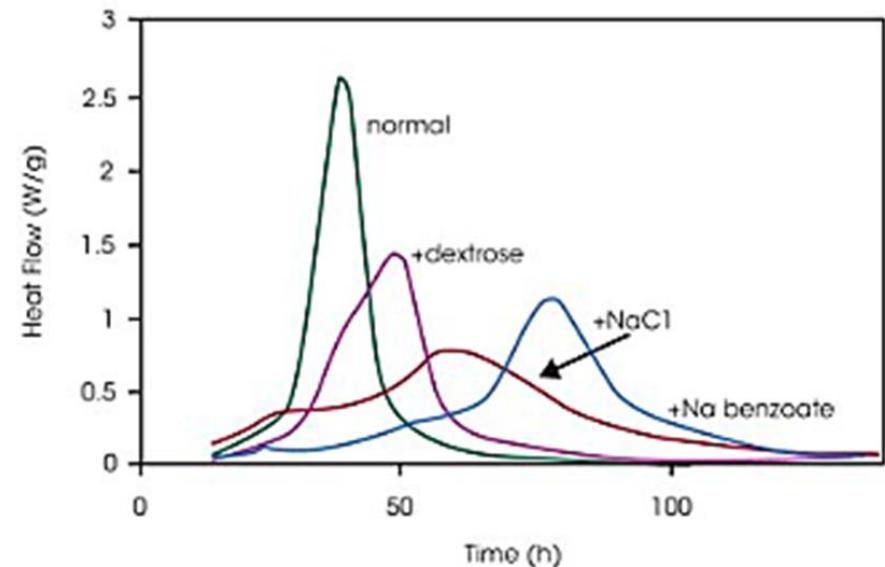




ΜΙΚΡΟ-ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ

ΣΤΑΘΕΡΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Χρησιμοποιούνται κλειστές αμπούλες που δημιουργούν ένα «αεροστεγές» σύστημα, καθιστώντας έτσι δυνατή τη μέτρηση της βακτηριακής δραστηριότητας υπό μη σταθερά αναερόβιες συνθήκες



ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΑ





ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΑ

Η ΣΥΝΘΕΤΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ
(**IMPEDANCE**) που αντιπροσωπεύεται από το σύμβολο Z , είναι ένα μέτρο της ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ στην ηλεκτρική ροή. Μετριέται σε Ohms.

Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΤΙΘΕΣΗ, που αξιοποιείται στην μικροβιολογία, μπορεί να οριστεί ως η αντίσταση στη ροή ενός εναλλασσόμενου ρεύματος που διέρχεται από ένα αγώγιμο μέσο ανάπτυξης μικροβίων.

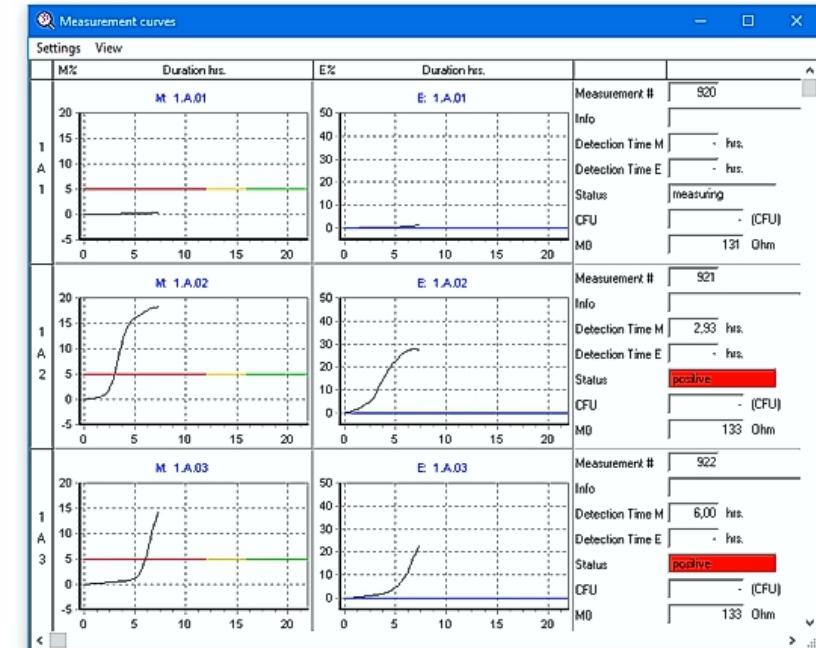
ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΑ \longleftrightarrow ΣΥΝΘΕΤΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ
CONDUCTIVITY \longleftrightarrow IMPEDANCE



ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΑ

Κατά τη διάρκεια της μικροβιακής ανάπτυξης, οι μεταβολικές διεργασίες παράγουν ηλεκτρικά μετρήσιμες αλλαγές στο μέσο ανάπτυξης λόγω του μεταβολισμού των θρεπτικών ουσιών υψηλού μοριακού βάρους σε μικρότερα ιονισμένα συστατικά που αυξάνουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα του μέσου.

Η μεταβολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, που παρακολουθείται με την πάροδο του χρόνου, είναι ανάλογη με την αλλαγή στον αριθμό των μικροοργανισμών και επομένως η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να μετρηθεί.



ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΑ

Κατά τη διάρκεια της μικροβιακής ανάπτυξης, οι μεταβολικές διεργασίες παράγουν ηλεκτρικά μετρήσιμες αλλαγές στο μέσο ανάπτυξης λόγω του μεταβολισμού των θρεπτικών ουσιών υψηλού μοριακού βάρους σε μικρότερα ιονισμένα συστατικά που αυξάνουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα του μέσου.



Η μεταβολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, που παρακολουθείται με την πάροδο του χρόνου, είναι ανάλογη με την αλλαγή στον αριθμό των μικροοργανισμών και επομένως η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να μετρηθεί.



- **RABIT system™** (Don Whitley Scientific, Shipley, UK),
- **Bactometer™** (bioMerieux, Marci l'Etoile, France)
- **Malthus™** (Malthus Instrument, Crawley, England).

Microbes detectable

- Aerobic mesophilic bacteria
- Gram negative bacteria
- Enterobacteriaceae, Coliforms, E.coli
- Enterococci
- Bacillus cereus
- Anaerobic and aerobic spore formers
- Salmonella, Listeria
- Yeasts and Moulds

Applications

- Enumeration of total viable counts
- Sterility tests
- Detection and quantification of index- and indicator microbes
- Pathogen screening
- Environmental monitoring
- Activity tests
- Screening and characterization of antimicrobial compounds



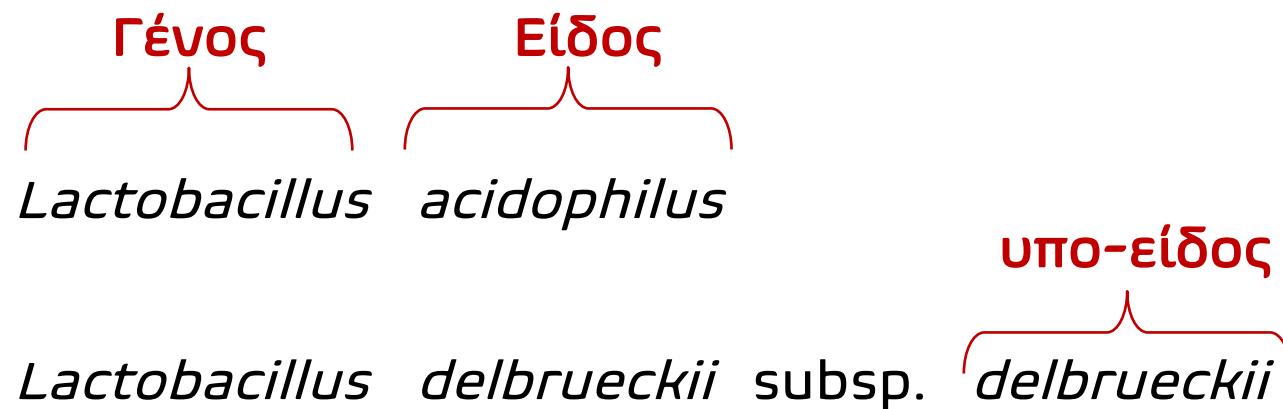
ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ/ ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Τα βρούμε την ταυτότητα του μικροοργανισμού σε επίπεδο

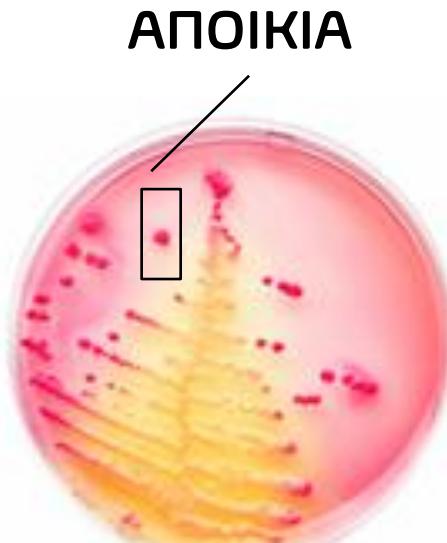
Γένους- Είδους – υποείδους (όταν υπάρχει)



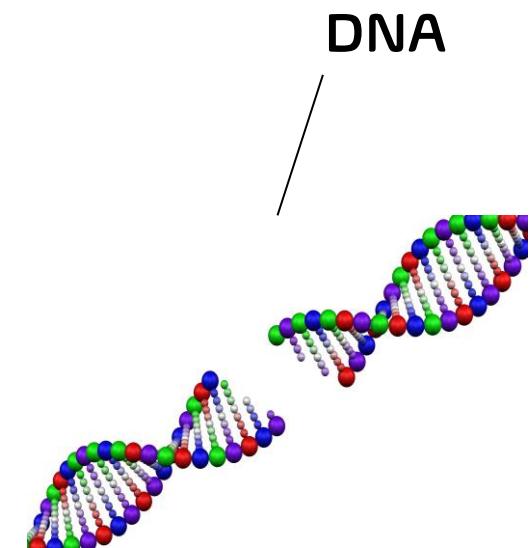
ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΚΡΙΣΙΜΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

*Ταυτοποίηση μικροοργανισμού
από ΑΠΟΙΚΙΑ ή από DNA;*

**CULTURE
DEPENTED;**



**CULTURE
INDEPENTED;**



ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΚΡΙΣΙΜΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

*Ταυτοποίηση μικροοργανισμού
από ΑΠΟΙΚΙΑ ή από DNA ;*

CULTURE INDEPENDENT: 'Όταν η ταυτοποίηση προέρχεται από
DNA

Πλεονεκτήματα

- Ταχύτατες
- Μεγάλης ευαισθησίας

Μειονεκτήματα

- Δεν ανιχνεύει μόνο ζωντανά κύτταρα αλλά και νεκρά
- Δεν είναι διαθέσιμο το κύτταρο για περαιτέρω μελέτη

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΚΡΙΣΙΜΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

*Ταυτοποίηση από
ΑΠΟΙΚΙΑ ή από DNA ;*

Εξαρτάται από το κίνητρο της ανάλυσης !

Δεν υπάρχουν καλύτερες ή χειρότερες
αλλά οι καταλληλότερες κατά περίπτωση

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

CULTURE
DEPENDED

Οι βιοχημικές δοκιμές είναι μια από τις παραδοσιακές μεθόδους για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών, που συνήθως εκτελούνται με φαινοτυπική ταυτοποίηση.

Για πολλά χρόνια αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς και συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται στις μέρες μας, ειδικά σε ορισμένες εργαστηριακές ρουτίνες ταυτοποίησης.

Ουσιαστικά θεωρείται ότι το προφίλ των ενζύμων των μικροοργανισμών είναι αντανάκλαση του γονιδιώματος.

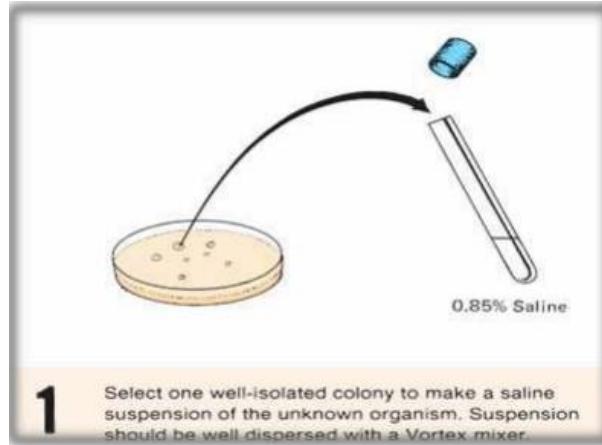


1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

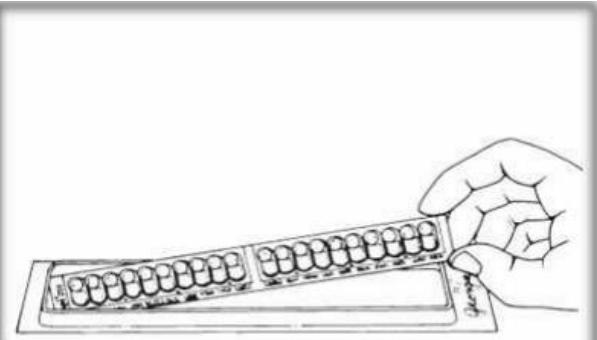
CULTURE DEPENTED



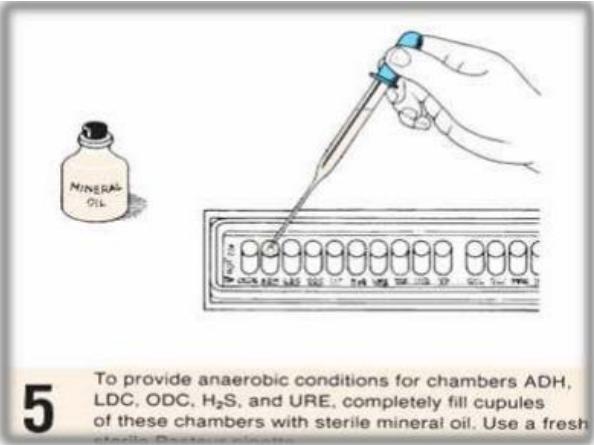
API Test



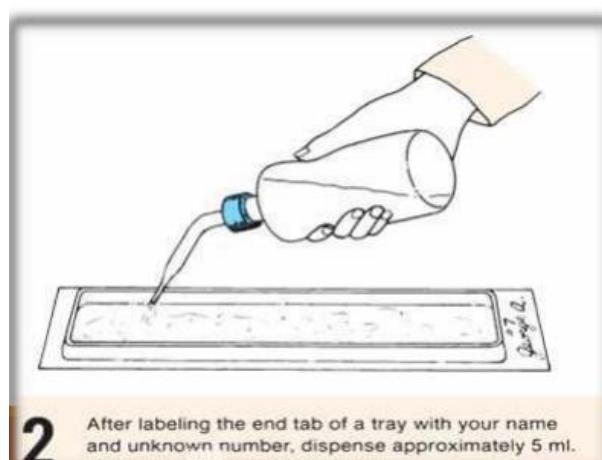
1 Select one well-isolated colony to make a saline suspension of the unknown organism. Suspension should be well dispersed with a Vortex mixer.



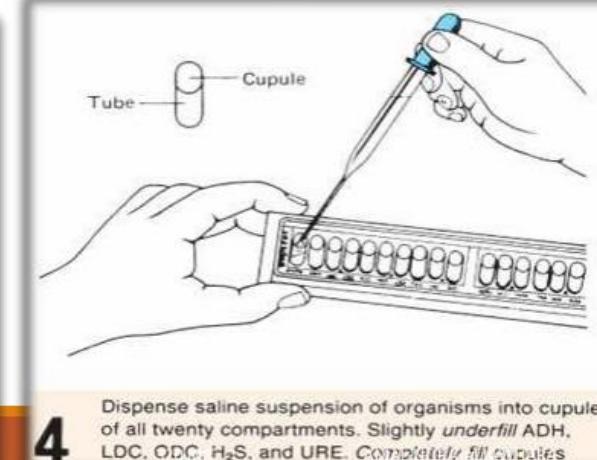
3 Place an API 20E test strip into the bottom of the moistened tray. Be sure to seal the pouch from which the test strip was removed to prevent contamination of remaining strips.



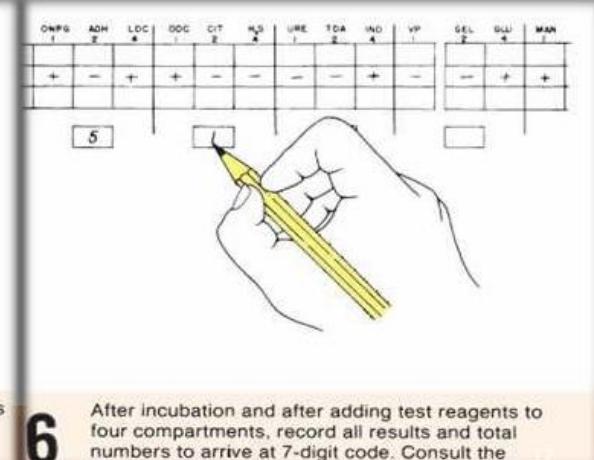
5 To provide anaerobic conditions for chambers ADH, LDC, ODC, H₂S, and URE, completely fill cupules of these chambers with sterile mineral oil. Use a fresh bottle of mineral oil.



2 After labeling the end tab of a tray with your name and unknown number, dispense approximately 5 ml. of tap water into bottom of tray.



4 Dispense saline suspension of organisms into cupules of all twenty compartments. Slightly underfill ADH, LDC, ODC, H₂S, and URE. Completely fill cupules.



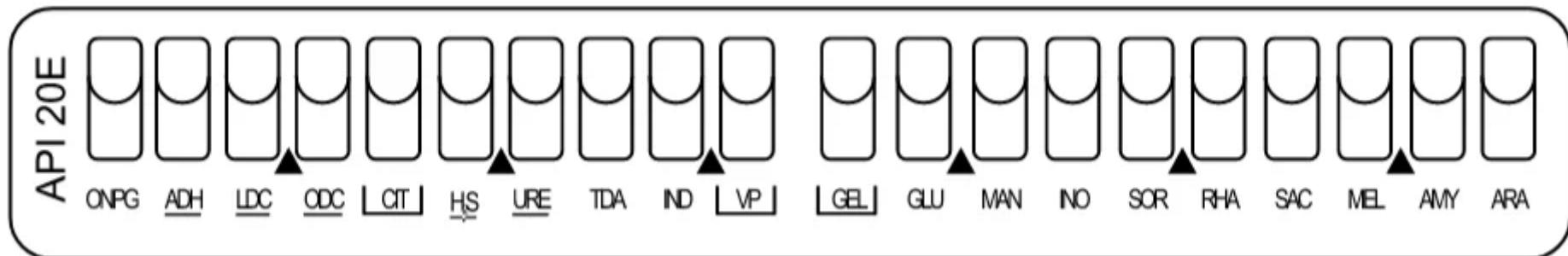
6 After incubation and after adding test reagents to four compartments, record all results and total numbers to arrive at 7-digit code. Consult the Analytical Profile Index for identification.

1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

CULTURE
DEPENTED



API Test



Tests Positifs

microbiologie-clinique.com

ΑΡΙ 20Ε



Tests Négatifs

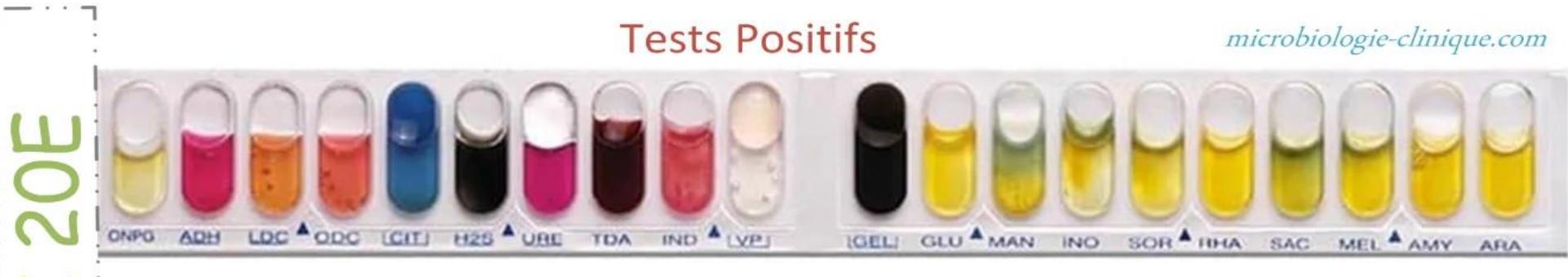


ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

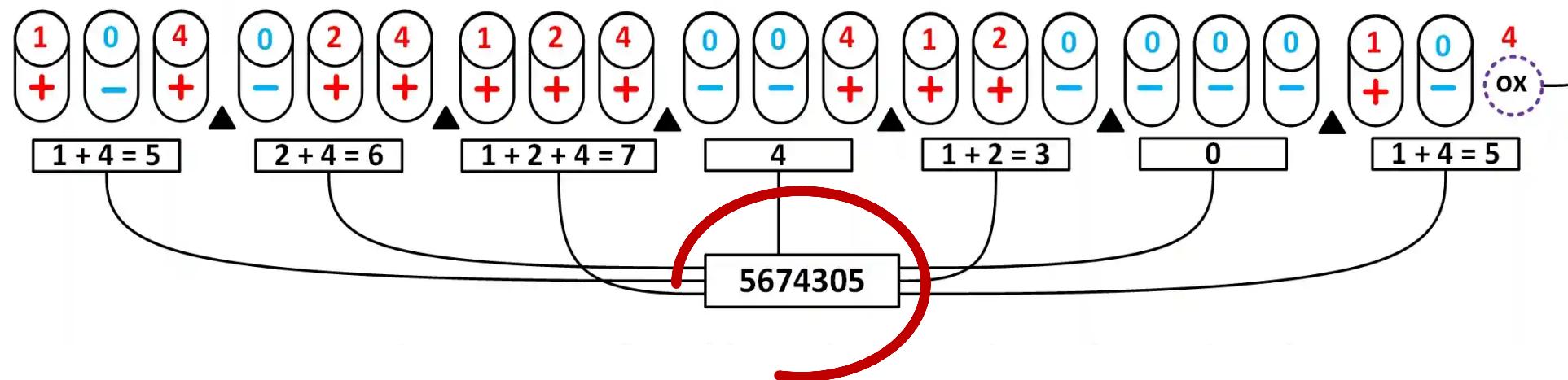
CULTURE
DEPENTED

API Test

Tests Positifs

microbiologie-clinique.com

20Ε



ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

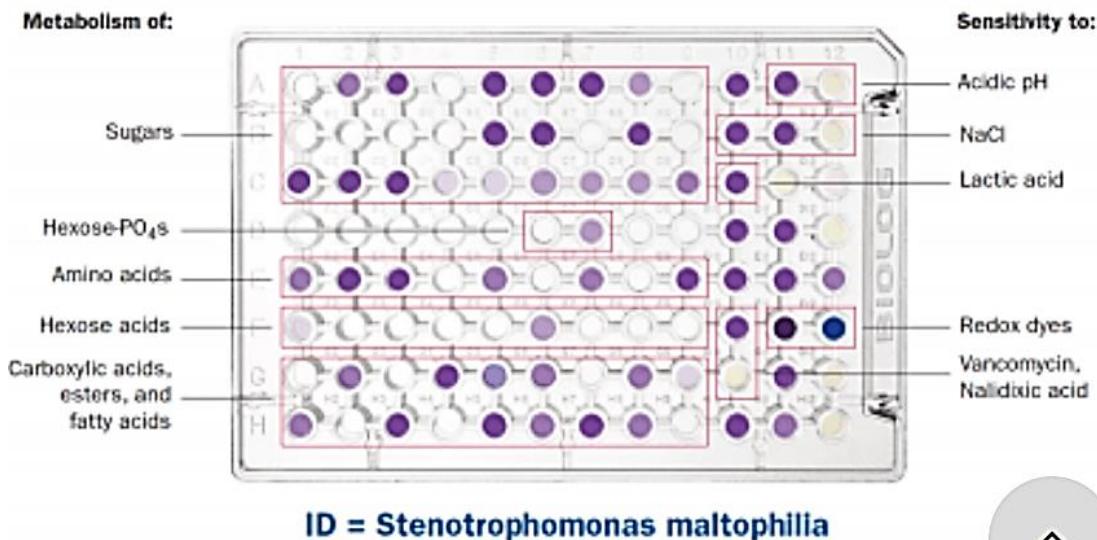
Αναπτύσσονται
συστήματα αντικειμενικής
ανάγνωσης και όχι απλά
από τον ανθρώπινο
παρατηρητή !



1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

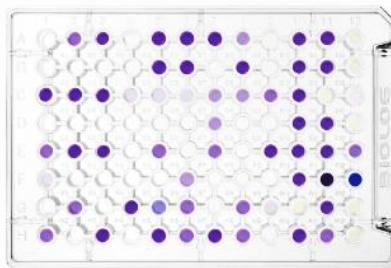
CULTURE
DEPENTED  **Biolog**

Η τεχνολογία αξιοποίησης της πηγής άνθρακα της **Biolog** εντοπίζει περιβαλλοντικούς και παθογόνους μικροοργανισμούς παράγοντας ένα χαρακτηριστικό σχέδιο ή «μεταβολικό αποτύπωμα» από διακριτές δοκιμαστικές αντιδράσεις που εκτελούνται σε μια μικροπλάκα 96 φρεατίων.

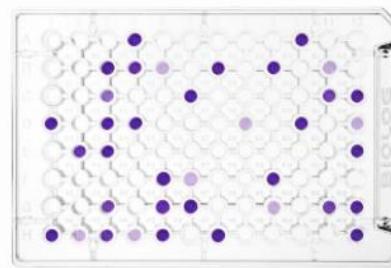


1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

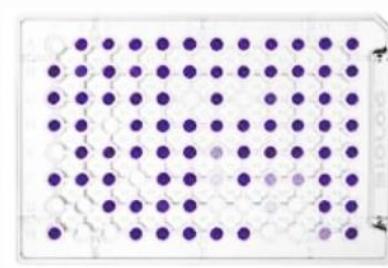
BIOLOG



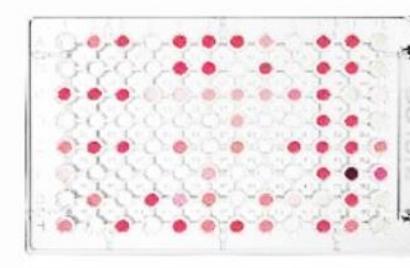
GEN III (Aerobes)



AN (Αναερόβια)



YT (Μαγιές)



FF (νηματοειδείς μύκητες)



ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ



RetroSpect 2.1.1

Functions Help

Main | Filter | Tracking | Trending | Plate Data | Dendrogram | ReID | Taxa Tree | Change Log

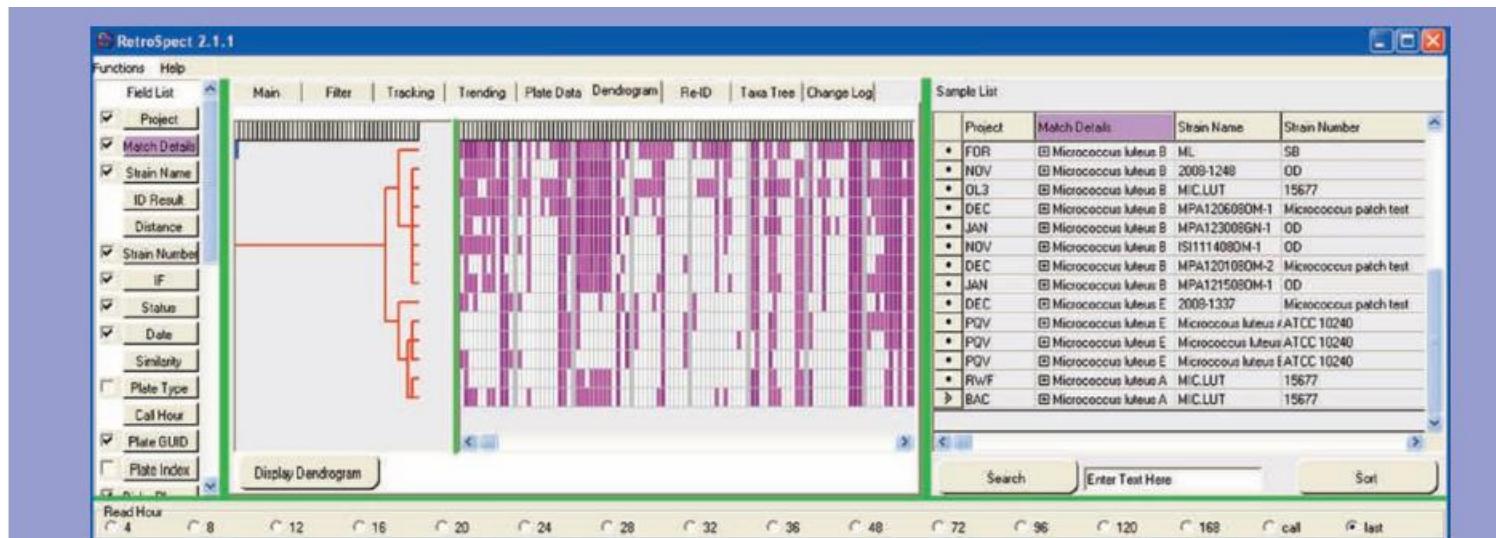
Sample List

Project	Match Details	Strain Name	Strain Number
• FOR	Micrococcus luteus B	MIL	SB
• NOV	Micrococcus luteus B	2008-1248	OD
• DL3	Micrococcus luteus B	MICLUT	15677
• DEC	Micrococcus luteus B	MPA120690M-1	Micrococcus patch test
• JAN	Micrococcus luteus B	MPA123008GN-1	OD
• NOV	Micrococcus luteus B	IS11114080M-1	OD
• DEC	Micrococcus luteus B	MPA1201080M-2	Micrococcus patch test
• JAN	Micrococcus luteus B	MPA1215080M-1	OD
• DEC	Micrococcus luteus E	2008-1337	Micrococcus patch test
• PQV	Micrococcus luteus E	Micrococcus luteus / ATCC 10240	
• PQV	Micrococcus luteus E	Micrococcus luteus ATCC 10240	
• PQV	Micrococcus luteus E	Micrococcus luteus [ATCC 10240]	
• Rwf	Micrococcus luteus A	MICLUT	15677
▷ BAC	Micrococcus luteus A	MICLUT	15677

Display Dendrogram

Read Hour: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 168, call, last

Isolate Prepare Inoculate Incubate and Read



The software interface displays a dendrogram on the left side, showing hierarchical clustering of samples. The main area shows a grid of purple and white squares representing the growth of different microorganisms on a plate. To the right is a table of sample details, including project name, match details, strain name, and strain number. Below the table are search and sort buttons. At the bottom, a timeline shows the read hour from 4 to 168, with options for 'call' and 'last'. Below the software interface are four photographs labeled 'Isolate', 'Prepare', 'Inoculate', and 'Incubate and Read', showing the physical steps involved in the process.

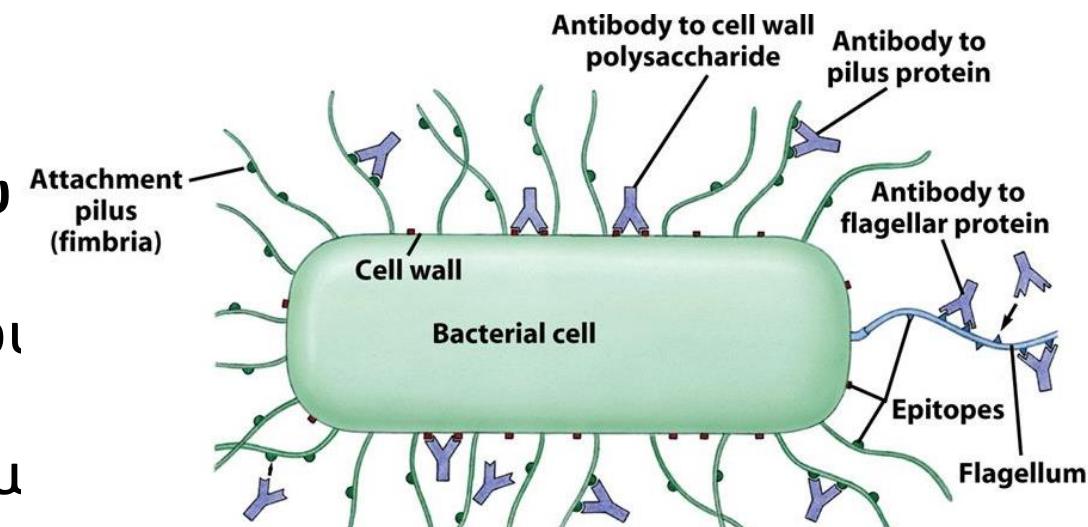


ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ

Βασίζονται σε αντιδράσεις ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ – ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Ως βακτηριακά αντιγόνα είναι οι επιφανειακές πρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτές οι δομές βοηθούν τα βακτήρια να εισβάλοι σε άλλους οργανισμούς αποκτώντας πρόσβαση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων.

Τα αντιγόνα αυτά αναγνωρίζονται από αντισώματα !!!

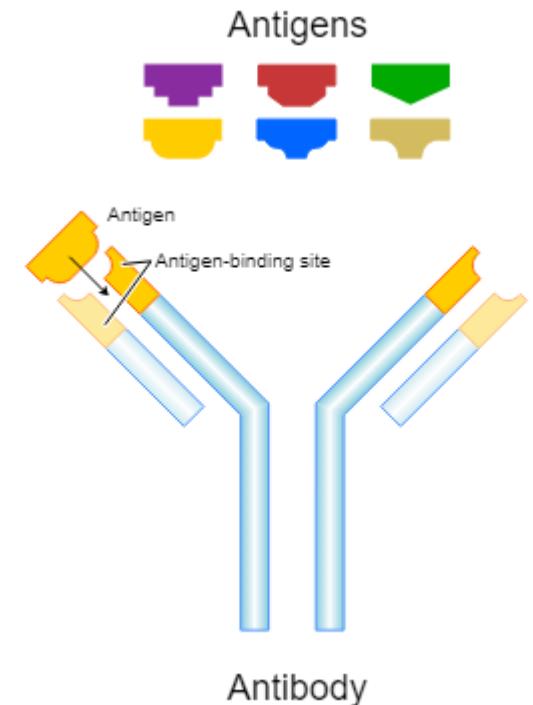


ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ – ELISA (*enzyme-linked immunoassay*)

2

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ – ELISA (*enzyme-linked immunoassay*)

ELISA (που σημαίνει ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία) βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αντίδραση/σύζευξη αντιγόνου-αντισώματος.





ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ - ELISA

Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) είναι μια μέθοδος **ποσοτικοποίησης ενός αντιγόνου που έχει ακινητοποιηθεί σε μια στερεά επιφάνεια.**

Η ELISA χρησιμοποιεί ένα ειδικό αντίσωμα με ένα ομοιοπολικά συζευγμένο ένζυμο.

Η ποσότητα του αντισώματος που δεσμεύει το αντιγόνο είναι ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου που υπάρχει, η οποία προσδιορίζεται με φασματοφωτομετρική μέτρηση της μετατροπής μιας διαυγούς ουσίας σε έγχρωμο προϊόν από το συζευγμένο ένζυμο.

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ - ELISA

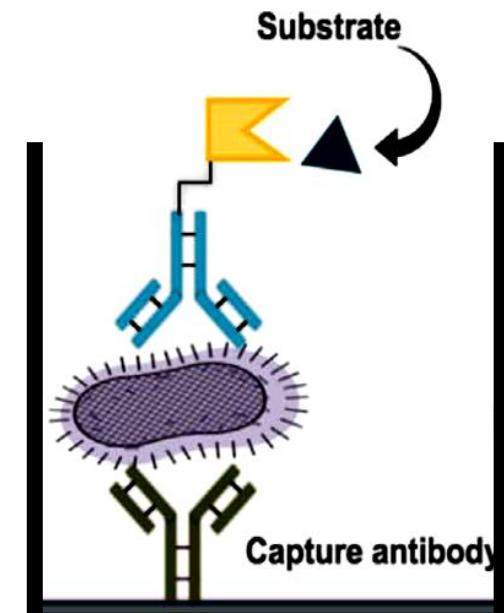
Ανοσοβιολογικός Εντοπισμός και καταμέτρηση

1

Στην εξωτερική πλευρά των βακτηρίων υπάρχουν εξαιρετικά εξειδικευμένα μόρια (λιποπρωτεΐνες, πρωτεΐνες) τα οποία μπορούν να συνδεθούν με επίσης εξειδικευμένα αντιγόνα.

2

Τα βακτήρια - μέσω των εξωτερικών εξειδικευμένων μορίων τους - ακινητοποιούνται από τα αντιγόνα στην επιφάνεια των μικροπλακών ELISA



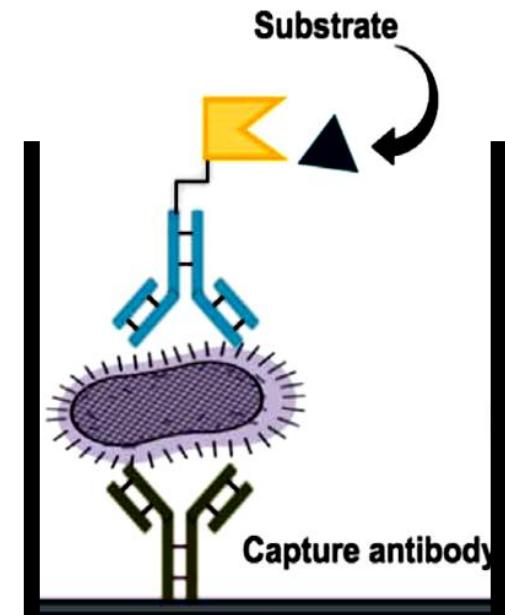
Sandwich ELISA

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ - ELISA

Ανοσοβιολογικός Εντοπισμός και καταμέτρηση

- 3** Νέα εξαιρετικά εξειδικευμένα αντιγόνα τα οποία φέρουν φθορίζουσες ενώσεις συνδέονται με το ακινητοποιημένο κύτταρο.
- 4** Όσο ισχυρότερη η εκπομπή φωτός τόσο περισσότερα τα συνδεδεμένα με το κύτταρο επισημασμένα αντιγόνα και άρα τόσο περισσότερα τα κύτταρα

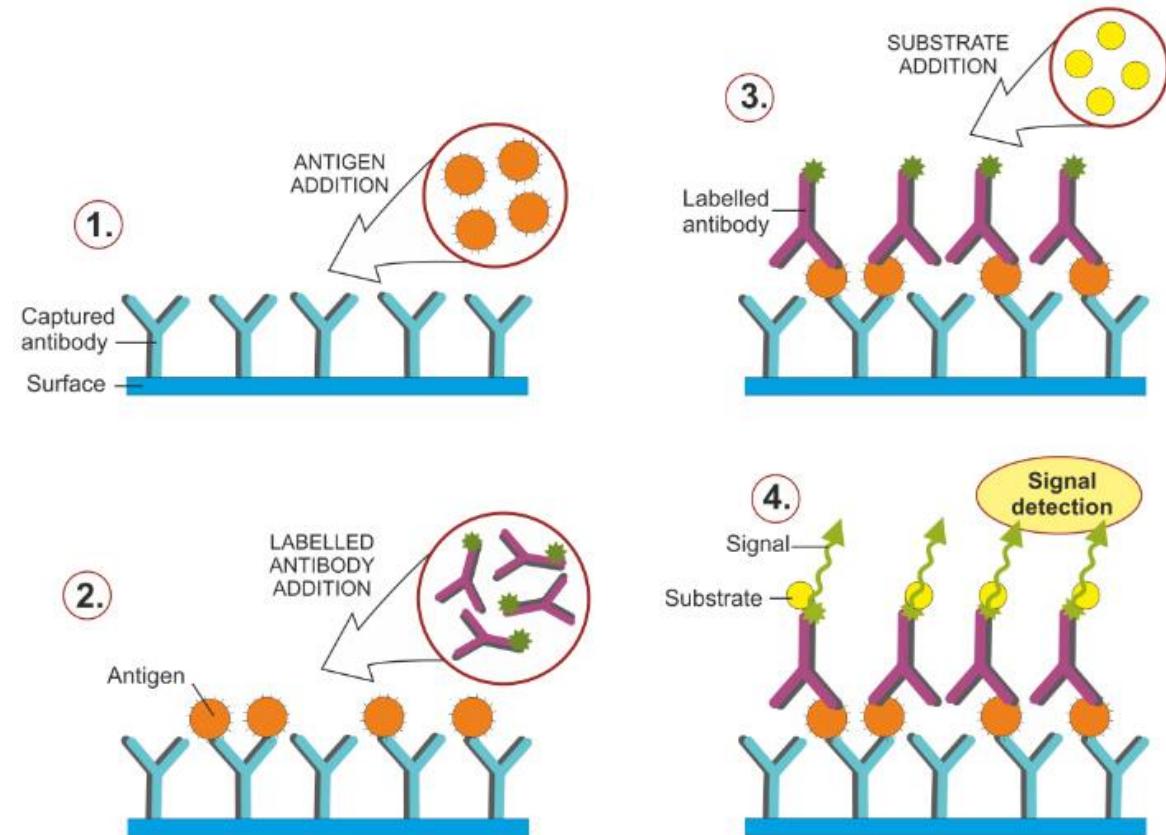
Sandwich type ELISA



Sandwich ELISA

2

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ - ELISA



2 ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ - ELISA

VIDAS, A HIGHLY PERFORMING TECHNOLOGY

INTERNATIONAL VALIDATIONS
ISO 16140 - AOAC

- More than 40 international validations
 - ISO 16140
 - AOAC RI and OMA
 - Health Canada
 - Other local validations (UK, China...)
- Assure high level of performance
- Simplify day to day workflow for industries exporting worldwide

- VIDAS Staphylococcal enterotoxin assay (SET2) described as the primary screening method in the Food and Drug Administration's (FDA) Bacteriological Analytical Manual (BAM).
- More than 100 posters and scientific publications demonstrate the level of performance of the VIDAS range on food and environmental samples.

A LARGE MENU

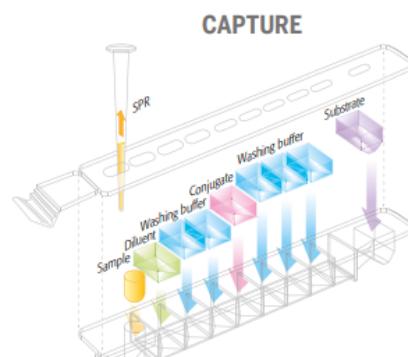
VIDAS offers a wide range of parameters to answer the need of detecting: *Salmonella*, *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Campylobacter* and Staphylococcal enterotoxins.



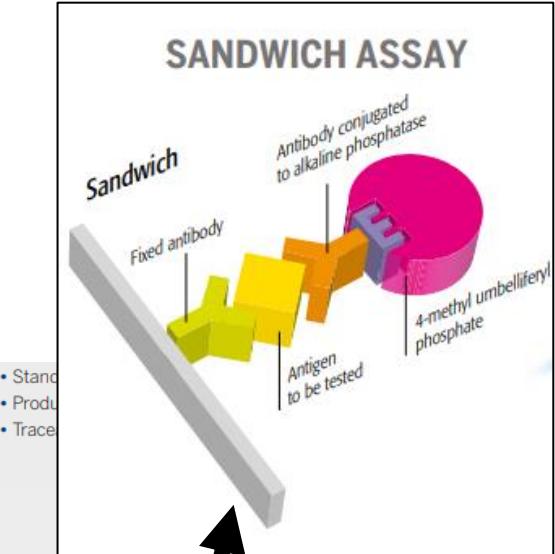
VIDAS® HOW DOES IT WORK?



- Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) based technology
- Ready-to-use reagents
- Innovative: antibodies engineering, immunoconcentration, phage recombinant protein technology
- Optimized protocols with bioMérieux solutions (ready-to-use media, identification)



SANDWICH ASSAY



DETECTION





ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ - ELISA

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- **Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα:** είναι σύνηθες οι ELISA να ανιχνεύουν αντιγόνα σε επίπεδο πικογράμματος με πολύ συγκεκριμένο τρόπο λόγω της χρήσης αντισωμάτων.
- **Υψηλή απόδοση:** τα εμπορικά κιτ ELISA είναι συνήθως διαθέσιμα σε μορφή πλάκας 96 φρεατίων. Αλλά η ανάλυση μπορεί εύκολα να προσαρμοστεί σε πλάκες 384 φρεατίων.
- **Εύκολο στην εκτέλεση:** τα πρωτόκολλα είναι εύκολο να ακολουθηθούν και απαιτούν λίγο χρόνο.
- **Ποσοτική:** μπορεί να καθορίσει τη συγκέντρωση του αντιγόνου σε ένα δείγμα.

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Η ανίχνευση βασίζεται σε αντιδράσεις ενζύμου/υποστρώματος και επομένως η ανάγνωση πρέπει να λαμβάνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα.
- Προεμπλουτισμός

2

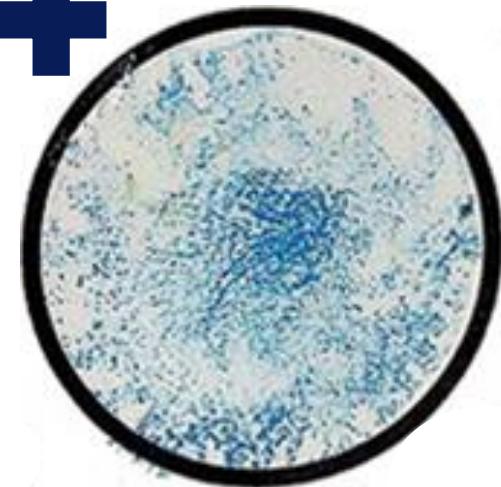
ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ / Agglutination test

2

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ / Agglutination test

Δοκιμή συγκόλλησης λατέξ

Όταν ένα σωματιδιακό ή αδιάλυτο αντιγόνο αναμιγνύεται με το αντίσωμά του παρουσία ηλεκτρολυτών σε κατάλληλη θερμοκρασία και pH, τα σωματίδια συσσωματώνονται ή συγκολλούνται.

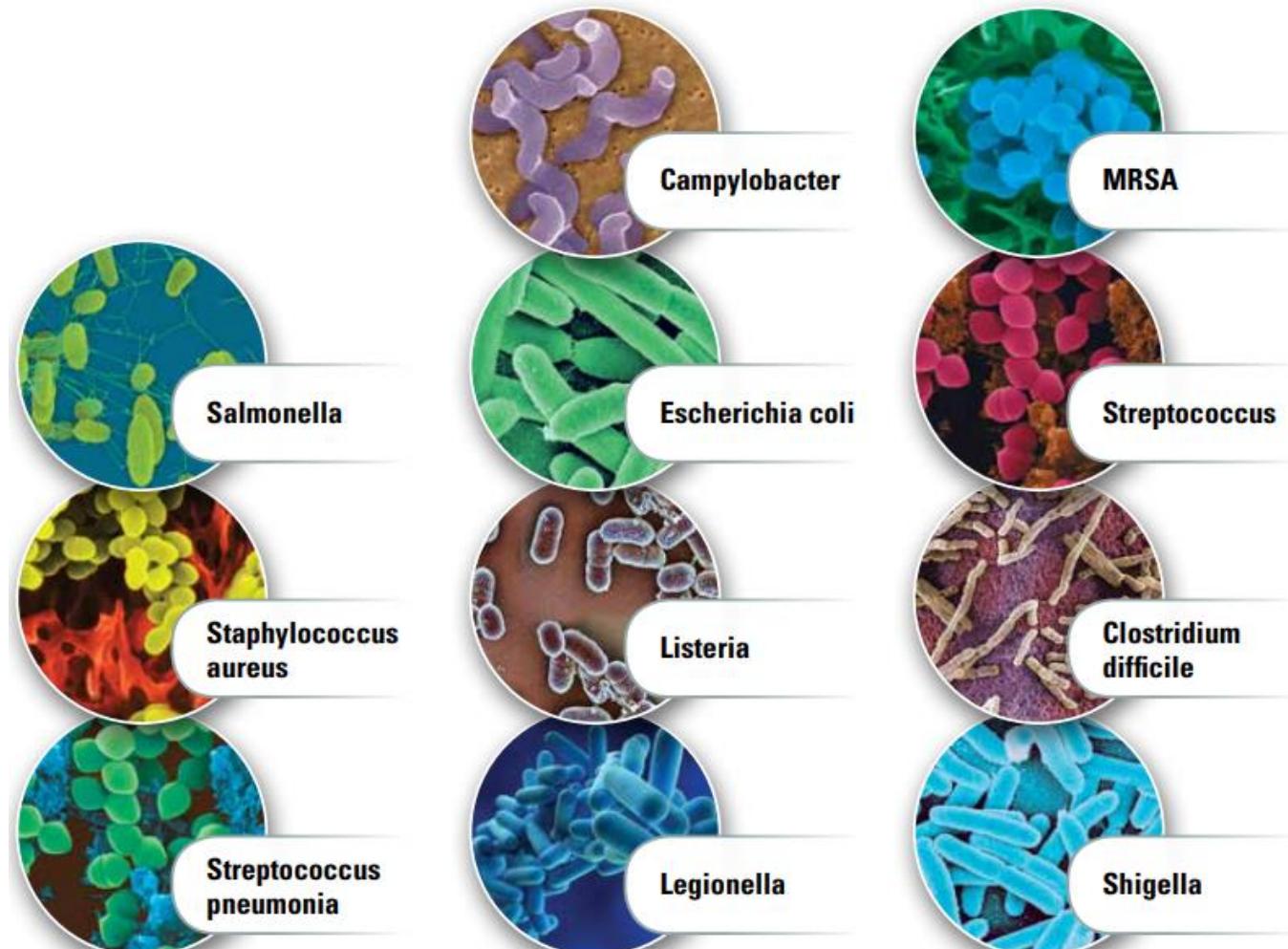




ΔΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ / Agglutination test

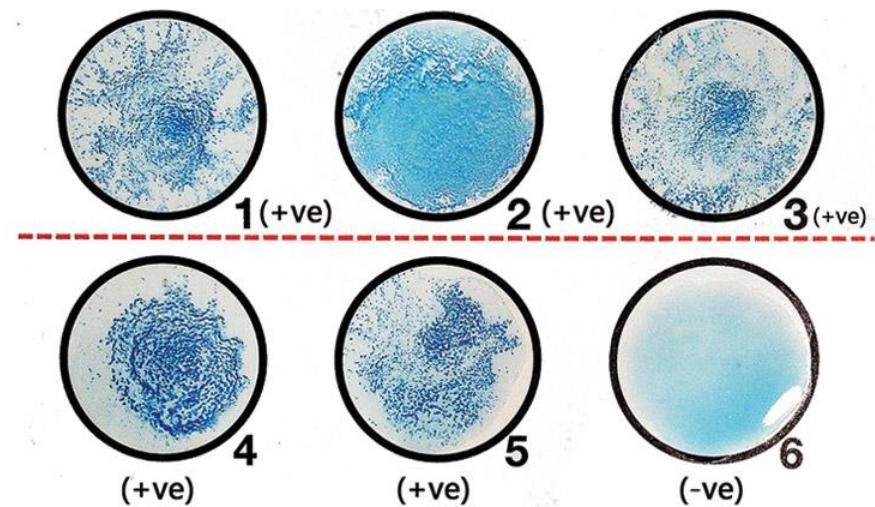
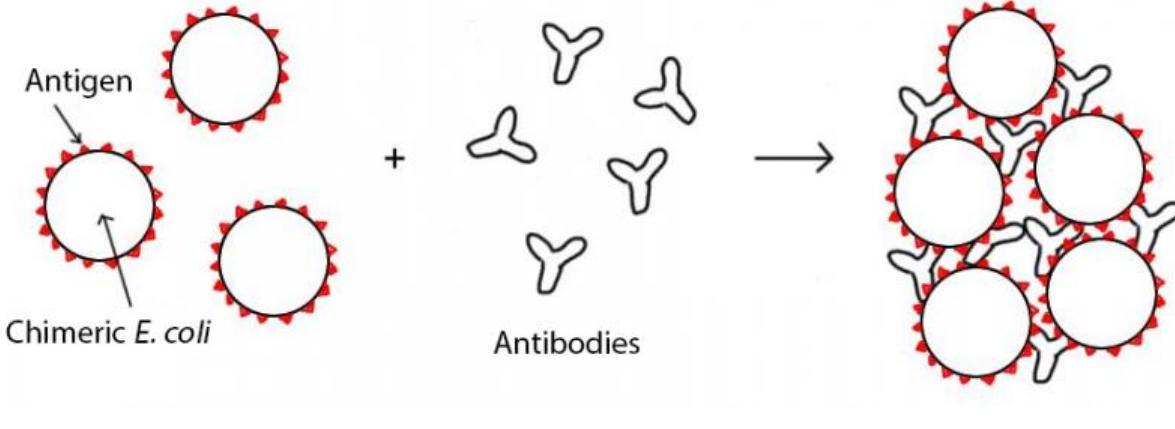
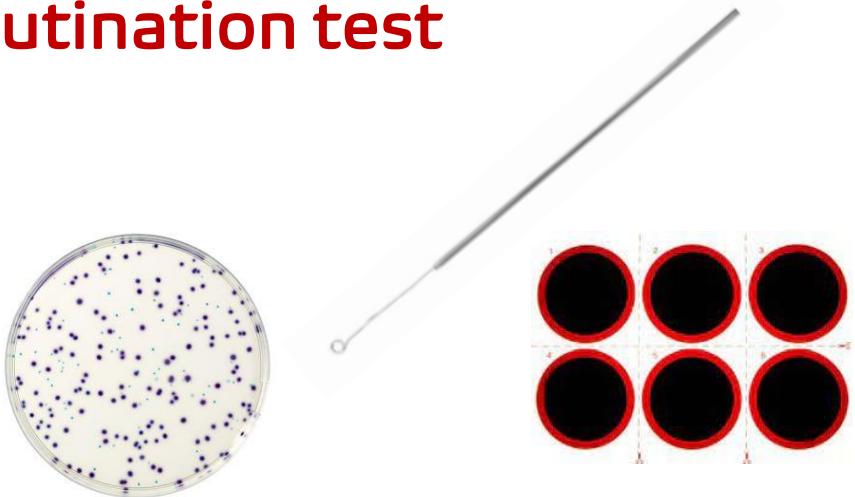
Latex agglutination products employ tried and tested traditional microbiology techniques that have a place in the heart of your microbiology laboratory. The tests are simple, **easy to use**, **reliable** and **accurate**. We offer solutions for confirmation of the following bacteria:

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΕΣ
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ
ΕΝΤΟΣ ΛΙΓΩΝ
ΛΕΠΤΩΝ



2

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ/ Agglutination test



Advancements in *Salmonella* Detection Methods



biosensors

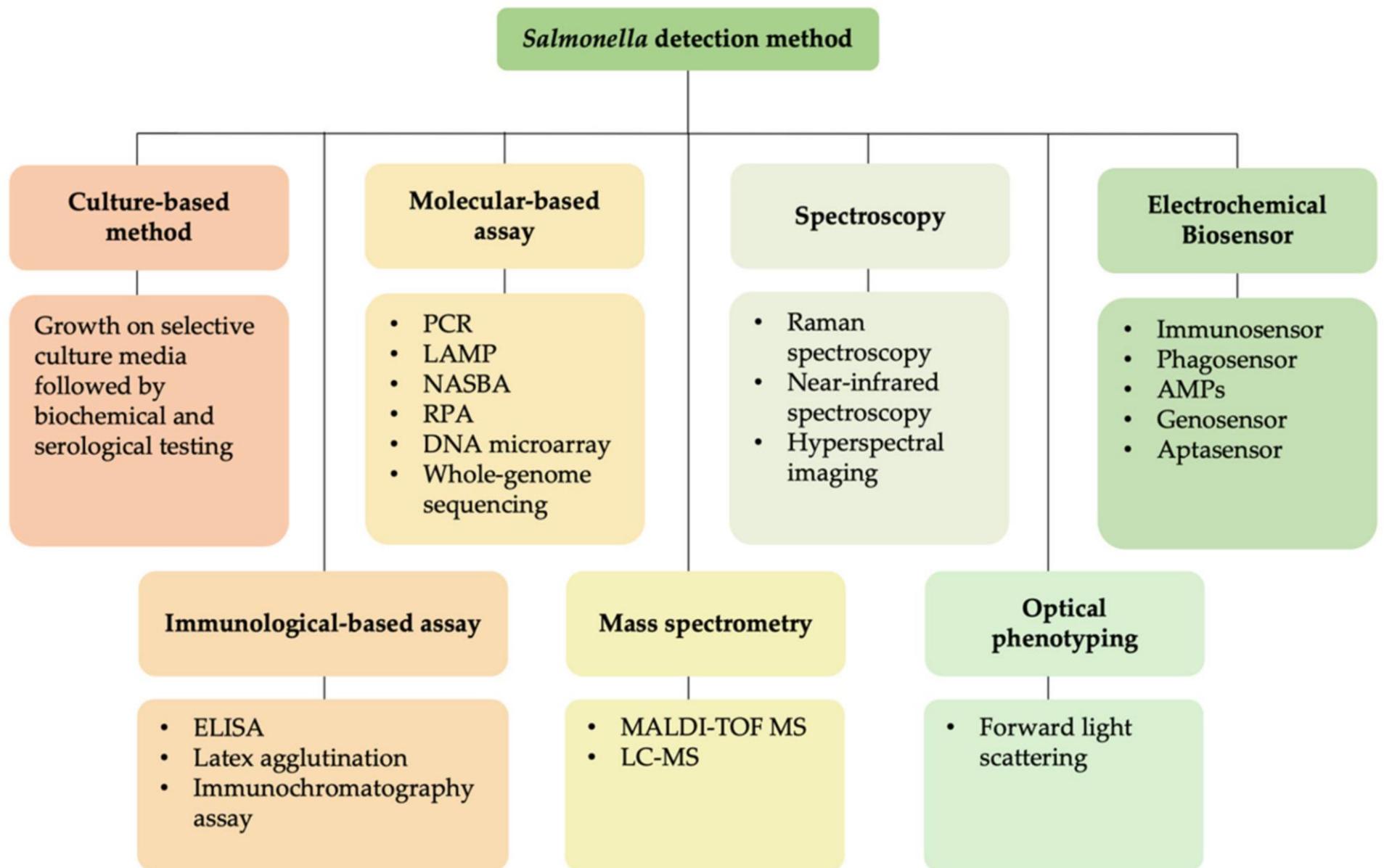


Review

Advancement in *Salmonella* Detection Methods: From Conventional to Electrochemical-Based Sensing Detection

Mohd Syafiq Awang ¹, Yazmin Bustami ², Hairul Hisham Hamzah ³, Nor Syafirah Zambry ⁴,
Mohamad Ahmad Najib ⁴, Muhammad Fazli Khalid ⁴, Ismail Aziah ^{4,*} and Asrulnizam Abd Manaf ^{1,*}

Τεχνικές Ανίχνευσης *Salmonella* spp.



Τεχνικές Ανίχνευσης *Salmonella* spp.

Table 1Immunologically-based commercial methods for *Salmonella* detection.

Method	Assay/Manufacturer	Analysis time	Sensitivity	Advantages	Disadvantages
Latex Agglutination	Spectate (May & Baker Diagnostics Ltd.)	3-5 min. for test only (after enrichment)	NR	- Specific and simple; - Used as a confirmatory analysis technique;	- Allows the detection and the serotyping/ grouping
	Welcolex color Salmonella (Welkolex)	3 min. for test only (after enrichment)	NR	- High positive and negative predictive values (PPV > 98.7%); - Easy interpretation.	- Only for screening proposes (presence/ absence); - Need storage at 2 - 8° C;
	Salmonella Latex test (Oxoid)	3-5 min. for only test (after enrichment) Total time 24 h	NR	- Easy interpretation; - Sensitivity of 100% and a specificity of 98.7% (Oxoid Limited).	- Effective only in some <i>Salmonella</i> serotypes; - Not validated for non-motile specie; - Store all reagents at 2 - 8° C.
	Bactigen (Wampole Laboratories)	3-5 min for test only (after enrichment)	NR	- Reliable results;	- Only applicable to pure culture or animal Specimens.
	Slidex (biomerieux)	NR	NR	- Easy interpretation.	
Immunomagnetic Precipitation	VIP for <i>Salmonella</i> (BioControl)	Total 24 h	NR	- Room Temperature storage; - Suitable for testing all food products - lateral flow assay	- Only positive or negative result; - Need confirmative tests for quantification; - 81.9% and 98.8% (relative sensitivity to reference method OMA, depending the contamination level of poultry). (Eijkelkamp et al. 2009).
	<i>Salmonella</i> enteritidis	Total analysis time 22h	NR	- Can be integrated in analytical detection procedure; - latex agglutination for positive samples.	- Relatively expensive cost;
ELISA	TRANSIA® Plate <i>Salmonella</i> Gold (Raiso Diagnostics Ltd.)	Enrichment/Selection 36 to 46 h. ELISA assay – 1.5 h	1 CFU/25 g (Eijkelkamp et al. 2009)	- Easy interpretation based on a simple color change; - Results in 24h with TAG 24 supplement.	- Need confirmative tests. - High LOD; - Long analysis time.
	TRANSIA® Card (Raiso Diagnostics)	Enrichment/Selection	Transia Card:	- Simplicity;	- The Transia Card is less selective in food samples;
	3M™ Tecra™ <i>Salmonella</i> VIA (Tecra)	18 to 24h. ELISA assay –10 min.	10 ² -10 ⁶ cells/mL	- Shorter enrichment and detection time.	- High LOD.
	3M™ Tecra™ <i>Salmonella</i> Unique Plus™ (Tecra)	Enrichment/Selection 18 to 24h. ELISA assay –less than 2 h.	1-5 CFU/25 g	- Good sensitivity;	- Long analysis time.
	Ridascreen® <i>Salmonella</i> (R-Biopharm)	Presumptive results in less than 23h	1 cell/25 g = 10 ⁴ cells/mL after enrichment	- Simultaneous detection of various pathogens in a single analysis. - Convenient in medium and small scale samples; - Simultaneous analysis of different	- Need of pre-enrichment; - Validated for: <i>Salmonella</i> spp. in food and environmental samples; - Relatively expensive cost.
				- Simple results interpretation; - All food application; - Satisfactory sensitivity; - Automation	
				- Approved for AFNOR EN/ISO16140, FDA and for ISO EN/ISO 16140; - Simplicity in results analysis, based in a simple color changes;	- Long analysis time.
				- Good sensitivity;	- Laborious;
				- Approved for food, feed and	- Only screening result (presumptive presence/absence).

(continued on next page)