Microbiología.Métodos Rápidos

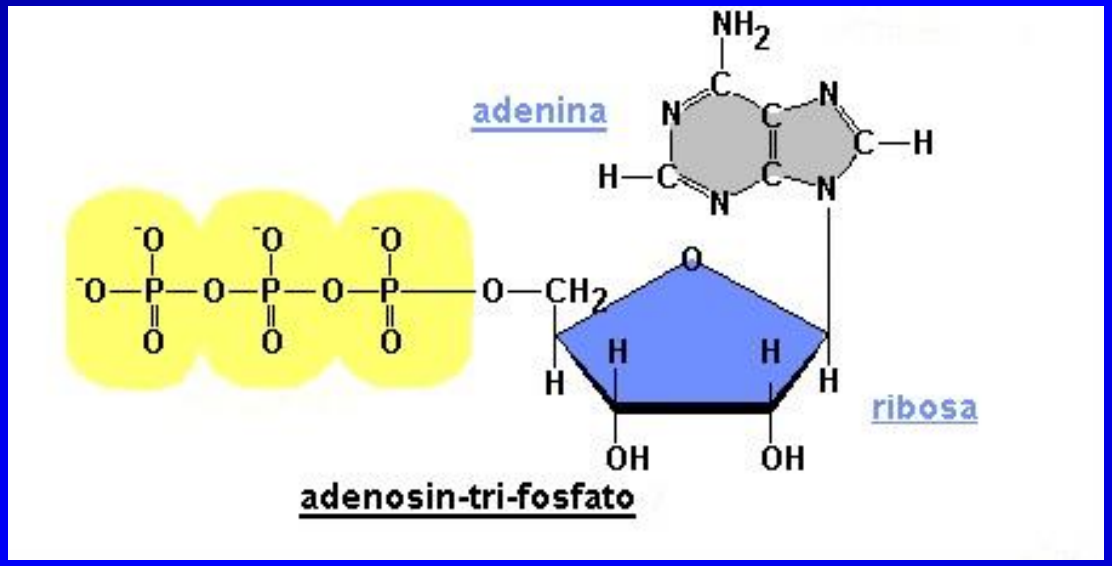
ATP - Bioluminiscencia

BC *Aplicaciones Analíticas, s.l.*

ATP. Bioluminiscencia

- Introducción
- Tecnología
- Aplicaciones

ATP. Introducción



ATP

ATP. Introducción

- El ATP en una molécula “universal” idéntica para todos los seres vivos
- El contenido de ATP varía entre los distintos microorganismos
- ¿Es posible diferenciarlos mediante bioluminiscencia?
- No.

ATP. Introducción

- ¿Cómo funciona?
- Mediante una reacción enzimática
- Utiliza una enzima presente en su origen en las luciérnagas Photinus pyralis: Luciferasa
- Un sustrato: D-Luciferina
- Para obtener Luz a partir del ATP y medirla en un luminómetro

ATP. Introducción

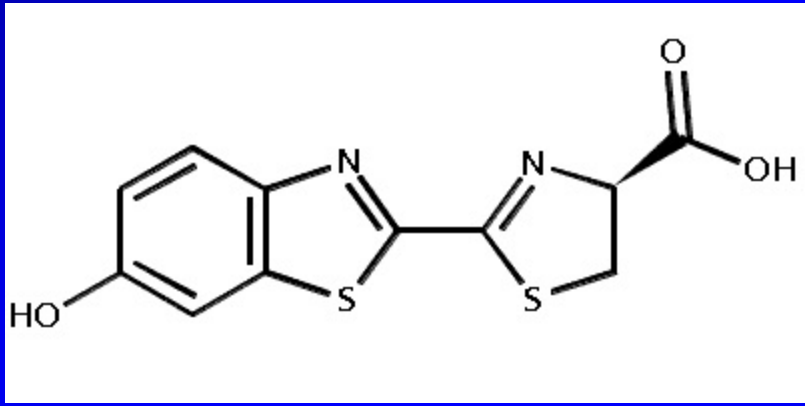
Luciérnaga Photinus pyralis

ATP. Introducción

Luciferasa Recombinante

SensiLux®

ATP. Introducción



Sustrato D- Luciferina

ATP. Introducción

ATP →		**LUZ**
D-Luciferina	**Luciferasa** **O_2, Mg^{2+}**	**Oxyluciferina** **PPi CO_2** **AMP**

Reacción enzimática 100% rendimiento
1 molécula de ATP = 1 fotón

ATP. Introducción

- Pero hay un problema .....

- Todas las células vivas contienen ATP
  - Células Somáticas
  - Microorganismos
  - ATP libre o extracelular

ATP. Introducción

- Tres fuentes de ATP químicamente idéntico
- La cuestión es que en microbiología la mayoría de veces sólo nos interesa medir el ATP microbiano
- La solución .....

Tecnología. Reactivos

- Proceso combinado para ....
- Eliminar selectivamente el ATP no microbiano
- Posteriormente analizar el ATP microbiano
- Se emplean hasta tres reactivos en función del tipo de muestra
- Aplicados en un orden preestablecido

Tecnología. Reactivos

- Para extraer el ATP somático sin afectar las células microbianas
- Se trata la muestra con productos tenso-activos (extractantes) que actúan selectivamente sobre las membranas de las células somáticas
- Pero el ATP sigue en la muestra como ATP libre.....

Tecnología. Reactivos

- Para eliminar el ATP libre o extracelular
- ATP-asa cuya actividad enzimática se adapta a cada matriz o tipo de productos
- Incubación de 15 - 45 min. en función de la matriz
- Incubación combinada con los extractantes para células somáticas

Tecnología. Reactivos

- Para extraer el ATP de las células microbianas
- Extractantes clásicos: Tris-EDTA, TCA, DMSO .....(diluir la muestra)
- En fase homogénea: Mezclas de detergentes (amplio espectro)
- Extractantes rápidos para evitar en mayor medida la competencia por el sustrato (ATP) de las ATP-asas endógenas

Tecnología. Reactivos

- Para valorar el ATP
- Luciferina-luciferasa
- Viales Liofilizados
- Sensibilidad:

(*) mejor que 1 femtomol de ATP ($1x10^{-15}$ mol)

- Estabilidad: Superior a 7 días una vez reconstituidos los viales

Tecnología. Sensibilidad (*)

- La sensibilidad final depende del tipo de matriz o producto
- Reacción enzimática con emisión de luz
- Condiciones idóneas = solución acuosa
- “Quenching” (to quench = mitigar, apagar)
- Factores contrarios:Turbidez, color, pH extremo, determinadas sustancias.....
- Necesitaremos más ATP o más microorganismos para poder detectar

Tecnología. Reactivos

SensiLux®

Desarrollo y producción de:

BC *Aplicaciones Analíticas, s.l.*

Tecnología. Luminómetros

- Para medir la luz emitida en la reacción se emplean los luminómetros
- Equipos dotados con detectores extremadamente sensibles:

  -Foto-multiplicadores

  -Foto-diodos de estado sólido
- Convierten los “quantums” de luz en pulsos eléctricos

Tecnología. Luminómetros

- Integran la señal (pulsos) durante un período de tiempo establecido
- Expresan los resultados como URL (Unidades Relativas Luz)
- “Relativas” porque cada fabricante calibra sus equipos en función de las características constructivas (detector, electrónica asociada, etc...)

Tecnología. Luminómetros

- Tipos de Luminómetros:

  - Tubo

  - Micro-placa

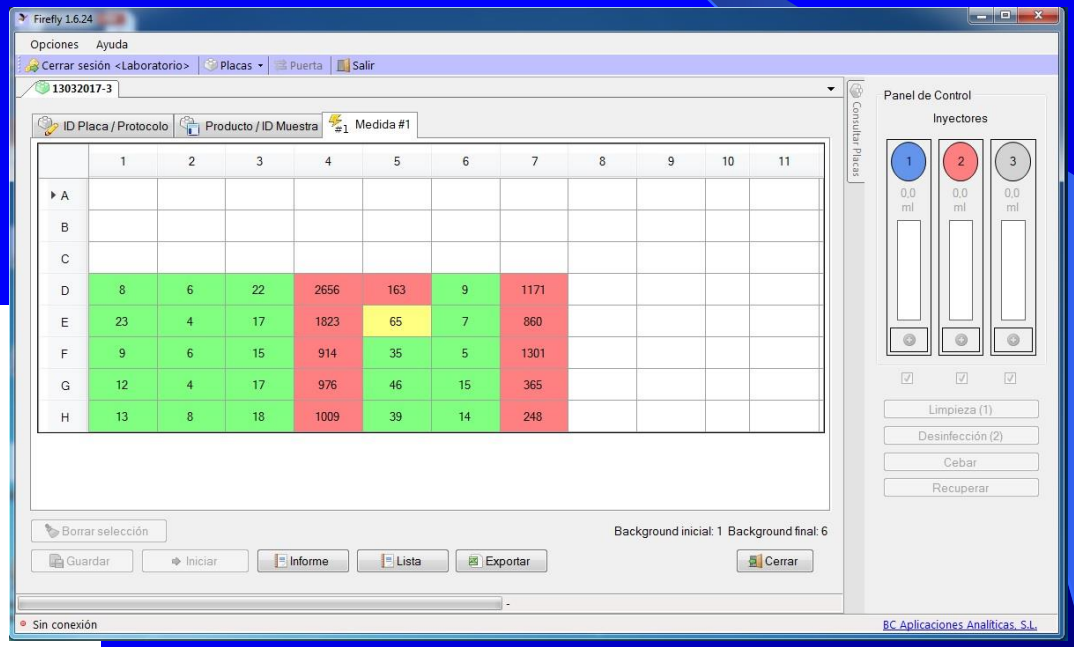
  - Portátiles

  - Especiales (para dispositivos integrados de control de higiene)

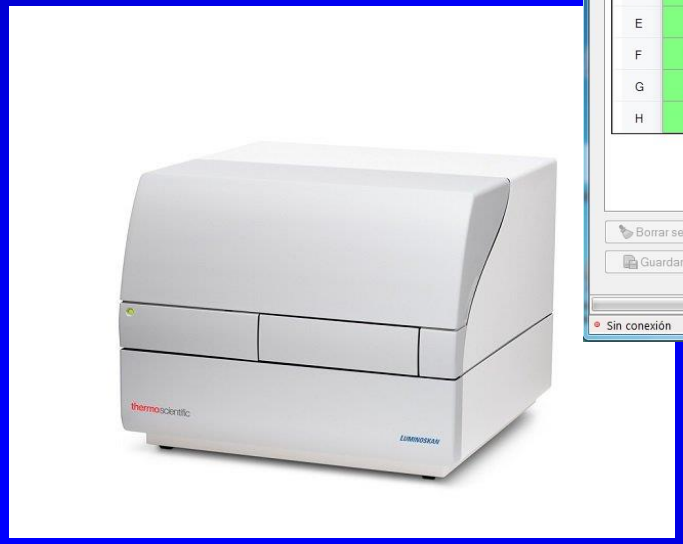
- Con inyectores de reactivos: 1 - 3 unidades (jeringa o fuelle)

Tecnología. Luminómetros

BC *Aplicaciones Analíticas, s.l.*



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B											
C											
D	8	6	22	2656	163	9	1171				
E	23	4	17	1823	65	7	860				
F	9	6	15	914	35	5	1301				
G	12	4	17	976	46	15	365				
H	13	8	18	1009	39	14	248				



Software “Firefly”

Tecnología. Luminómetros

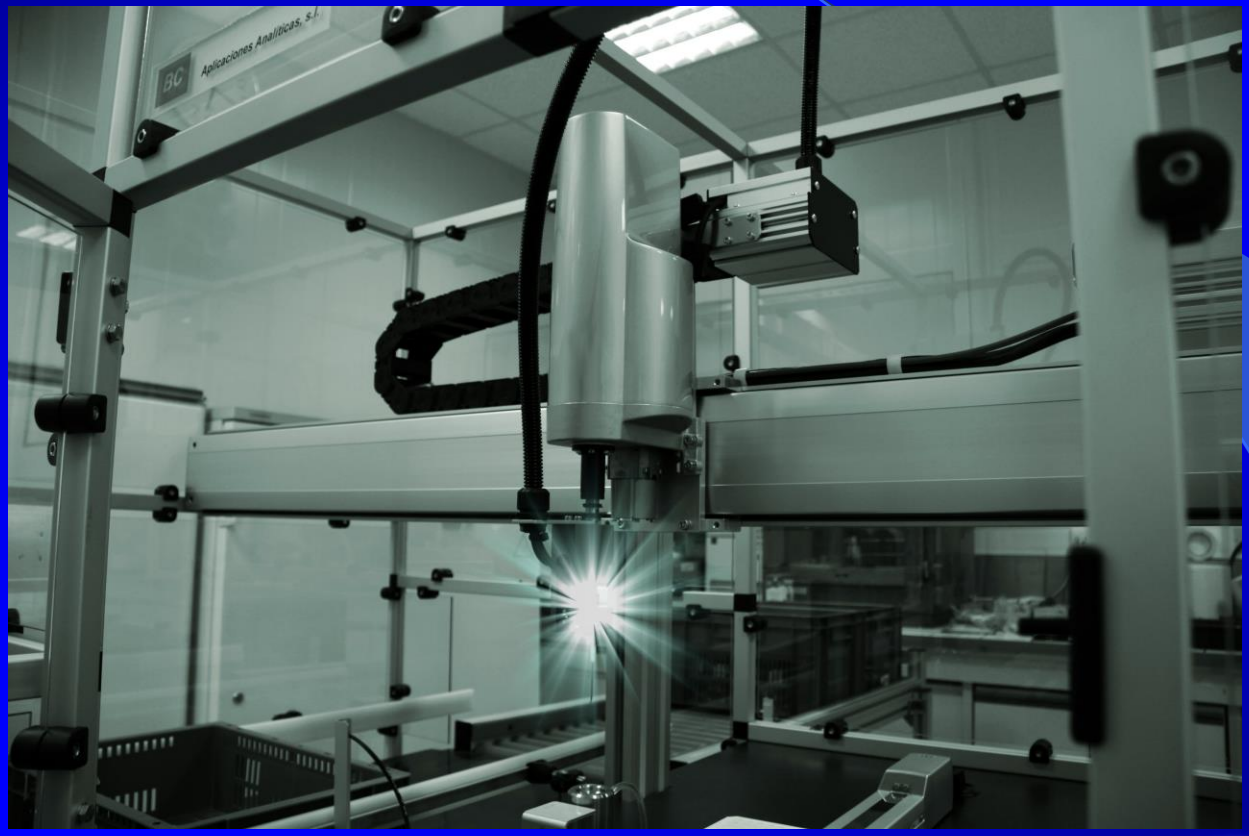
hygiena

Tecnología. Automatización

- Para automatizar esta tecnología disponemos de:

- Los Robots Toma-muestras: Capaces de procesar 400 muestras /hora y de dispensar reactivos auxiliares (ATP-asa)
- Luminómetros de Micro-placa: Capaces de analizar entre 400 -700 tests/hora
- Equipos “transfer”
- Proyectos “llaves en mano”

Tecnología. Automatización



Tecnología. Automatización

Aplicaciones

- Control Microbiológico de producto acabado
- Control de Higiene en Superficies y Aguas de aclarado
- Aplicaciones especiales

Control de Producto Acabado

Control de Producto Acabado

- Control de esterilidad alimentario para:
  - Leche UHT, Esterilizada, ESL, Postres lácteos
  - Bebidas de Extractos Vegetales
  - Zumos, mezclas de zumo y leche
  - Cremas y Caldos
  - Bebidas refrescantes y otras aplicaciones
- Productos cosméticos, de aseo personal y detergentes

Control Higiene

hygiena

AquaSnap™ TOTAL

UltraSnap™

SuperSnap™

Control Higiene

- Medida del **ATP TOTAL** como indicador de una limpieza incorrecta en superficies y aguas de aclarado
- Permite la acción correctiva de inmediato (resultados en segundos)
- Integrable en el APPCC
- Valores de decisión (pasa o falla)
- Luminómetros portátiles
- Dispositivos integrados

Aplicaciones. Resumen (I)

Tipo de producto	Kits	Análisis directo	Filtración de membrana	Incubación directa del envase	Incubación previa en caldo
Leche UHT, esterilizada, ESL	Kit	Si	No	2- 3 días	No
Bebidas de extractos vegetales	Kit	Si	No	2- 3 días	No
Mezclas zumos y leche UHT	Kit	Si	No	2- 3 días	No
Control de Superficies	Dispositivos	Si	No	No	No
Aguas de aclarado	Dispositivos	Si	No	No	No
ATP total	Kit	Si	?	No	No
Postres lácteos termizados	Kit	Dilución 1 / 10	No	2- 3 días	No

Aplicaciones. Resumen (II)

Tipo de producto	Kits	Análisis directo	Filtración de membrana	Incubación directa del envase	Incubación previa en caldo de cultivo
Productos cosméticos y detergentes	Kit + Aplicaciones	Si en caldo	?	No	24- 48 h.
Zumos UHT	Kit	Si	No	2- 3 días	No
Productos de aseo personal	Kit + Aplicaciones	Si en caldo	?	No	24- 48 h
Refrescos y bebidas	Kit	Si	Si	?	No

www.bcaplicaciones.com

FIN