Porównanie wydajności: UltraSnap® i SuperSnap® w systemie EnSURE® Touch z testem CleanTrust™ w luminometrze CleanTrust™

Analiza systemu monitorowania higieny opartego na ATP

Wprowadzenie

Niniejszy biuletyn techniczny zawiera bezpośrednie porównanie wydajności systemów monitorowania ATP firm Hygiena i YiLi Biotechnology Co., Ltd. Oba systemy są przeznaczone do pomiaru poziomu adenozynotrifosforanu (ATP) jako wskaźnika czystości i higieny.

Rozwiązanie firmy Hygiena obejmuje luminometr EnSURE® Touch oraz szereg urządzeń do testów ATP, takich jak UltraSnap®, SuperSnap® i AquaSnap®. Urządzenia te wykorzystują odczynniki oparte na lucyferazie do wykrywania ATP za pomocą bioluminescencji, a wyniki są wyrażane w względnych jednostkach światła (RLU).

Firma YiLi Biotechnology, założona w 2024 roku w Qingdao w Chinach, wprowadza na rynek swój luminometr CleanTrust oraz powiązane z nim urządzenia do badania ATP i białek/alergenów. Chociaż protokoły tej firmy są podobne do protokołów firmy Hygiena, YiLi podkreśla, że skuteczność jej metody jest równoważna z metodą firmy Hygiena.

W niniejszym biuletynie porównujemy wydajność obu luminometrów oraz odpowiadających im zestawów do pobierania próbek w identycznych warunkach testowych. Testy ujawniły różnicę w wydajności w kluczowym obszarze funkcjonalnym, co zostanie podkreślone w porównaniu.

Materiały, sprzęt, przyrządy i odczynniki

- Luminometr EnSURE Touch (Hygiena)
- Wymazówki SuperSnap (3 partie)
- Wymazówki UltraSnap (3 partie)
- Luminometr CleanTrust (YiLi)
- Wymazówki powierzchniowe CleanTrust (2 partie)
- Inkubatory (30 ± 2 °C, 37 ± 1 °C, 20 ± 2 °C, 5°C ± 3,0 °C)
- Elektrody pH METTLER TOLEDO InLab® Sensor
- Głaszczki w kształcie litery L
- Waciki nasączone alkoholem
- ATP, 100 nm
- Środki dezynfekujące (Sagrotan®, Apesin® AP 100 plus i Incidin® Pro)
- Agar i bulion tryptowo-sojowy
- Agar i bulion Sabourauda z dekstrozą
- Roztwór NaCl-peptonowo-buforowy (BSCP)
- Roztwór soli fizjologicznej + Tween
- Bufor trisowo-octowy z EDTA (TAE, 10X)
- Kwas octowy

Sagrotan® jest zastrzeżonym znakiem towarowym i marką firmy Reckitt Benckiser Holding GmbH & Co. KG; Apesin® AP 100 jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Werner & Mertz Professional Vertriebs GmbH; Incidin® Pro jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy EcoLab; InLab® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy METTLER TOLEDO.

Mikroorganizmy

Do badań wykorzystano następujące organizmy:

Gatunek	Numer szczepu
Staphylococcus aureus	ATCC 6538
Escherichia coli	ATCC 11229
Bacillus cereus	ATCC 11778
Saccharomyces cerevisiae	ATCC 9763

Metodologia

Każdy system wymazówek oparty na ATP był używany zgodnie z instrukcjami zawartymi w odpowiedniej instrukcji obsługi. Ponadto, aby ustalić, czy na wyniki wpływa wymazówka, czy urządzenie, wymazówki każdego producenta zostały zmierzone w obu urządzeniach. Wymazówka CleanTrust Surface Swab została najpierw przetestowana w luminometrze YiLi, a następnie w luminometrze EnSURE Touch. Wymazówki UltraSnap lub SuperSnap zostały najpierw przetestowane w luminometrze EnSURE Touch, a następnie w luminometrze YiLi. Zapewniło to, że wszystkie wymazówki zostały przetestowane w obu urządzeniach.

Stosując to podejście, przeprowadzono następujące analizy:

Określenie granicy wykrywalności (LOD) czystego analitu ATP (czułość)

W celu określenia czułości obu systemów na wymazniki naniesiono bezpośrednio 10 µl seryjnie rozcieńczonego ATP o stężeniu od 5 000 do 0,05 nM. Następnie wymazniki aktywowano i odczytano zgodnie z instrukcją obsługi zestawu. Każdy test stężeniowy obejmował 8 powtórzeń.

Określenie zdolności buforowej

Aby określić odporność wacików na działanie niskiego pH podczas czyszczenia powierzchni, do buforu aktywującego dodano 50 µl kwaśnych buforów o stężeniach kwasu octowego wynoszących 1 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM lub 500 mM. Waciki poddano aktywacji, a następnie przeprowadzono pomiary każdej próbki. Po tym wstępnym pomiarze do wymazów dodano 10 µl 50 nM ATP i ponownie przeprowadzono pomiar.

Odporność na środki dezynfekujące do powierzchni

Wiele środków dezynfekujących ma charakter kwasowy lub zasadowy. Dlatego urządzenia do pobierania próbek powinny być w stanie funkcjonować w obecności niskich stężeń pozostałości środków dezynfekujących po zakończeniu czyszczenia. Na podstawie badań wydajności buforowania zauważono, że obecność środków do dezynfekcji powierzchni może powodować trudności podczas stosowania wymazówek YiLi, co stanowi prawdziwe wyzwanie w procesach czyszczenia w zakładach produkcji żywności. Aby to sprawdzić, do buforu aktywującego w urządzeniach do pobierania próbek dodano 10 µl różnych środków dezynfekujących w celu symulacji pobierania próbek z powierzchni poddanej działaniu środków dezynfekujących. Próbkę zmierzono, a następnie dodano do niej 10 µl ATP o stężeniach 500, 50, 10, 1, 0,5 i 0,1 nM i ponownie przeprowadzono pomiar.

Czułość wykrywania mikroorganizmów

Hodowle czterech różnych mikroorganizmów, pozostawione na noc, zostały poddane seryjnym rozcieńczeniom 10-krotnym. Z tych rozcieńczeń pobrano wymazy, dodając do nich po 30 µl każdego rozcieńczenia, w celu analizy czułości systemu w zakresie wykrywania mikroorganizmów. Do analizy wybrano reprezentatywny organizm Gram-dodatni – *Staphylococcus aureus*; organizm Gram-ujemny – *Escherichia coli*; organizm tworzący przetrwalniki – *Bacillus cereus*; oraz pospolite drożdże – *Saccharomyces cerevisiae*. Po dodaniu do wymazówki została ona aktywowana i zmierzona za pomocą obu luminometrów, a pomiary przeprowadzono trzykrotnie.

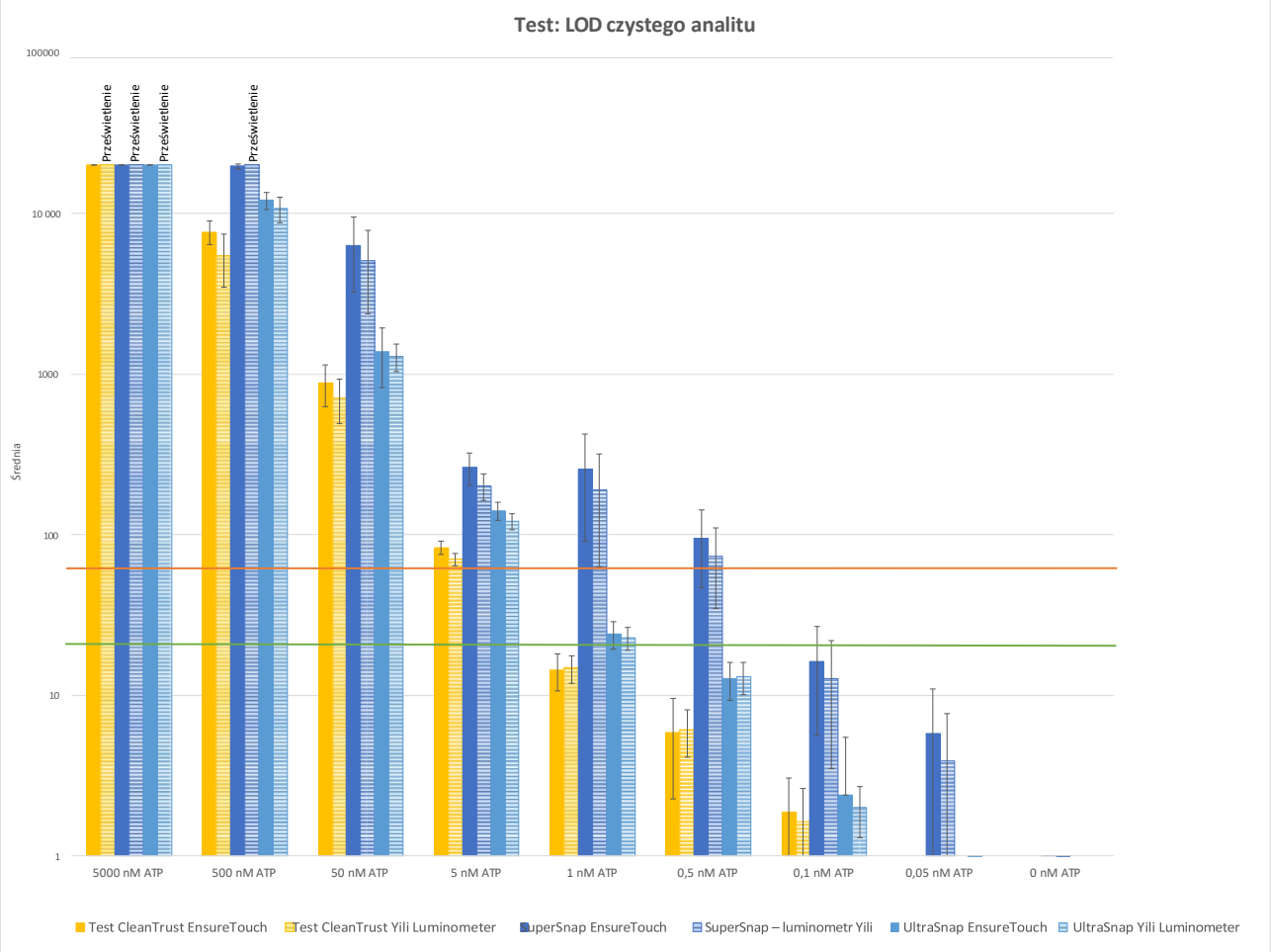
W przypadku wymazówek CleanTrust jeden wymazek był mierzony trzykrotnie na przemian, najpierw za pomocą urządzenia YiLi, a następnie za pomocą urządzenia Hygiena. (6 pomiarów w ciągu 1,5 minuty: na przemian: YiLi, Hygiena, YiLi, Hygiena, YiLi, Hygiena). W przypadku wymazówek SuperSnap i UltraSnap proces został odwrócony: najpierw urządzenie Hygiena, a następnie YiLi. Stężenia CFU określono poprzez posiew 100 µl każdego stopnia rozcieńczenia na płytkach TSA i SDA w trzech powtórzeniach.

Wyniki i omówienie

Określenie granicy wykrywalności (LOD) czystego analitu (czułość)

Przy niższych stężeniach wymazówki Hygiena wykazały wyższą czułość: SuperSnap wykrywał ATP przy stężeniach wynoszących zaledwie 1 nM i 0,5 nM, podczas gdy UltraSnap wykrywał ATP przy stężeniu 1 nM. Natomiast wymazówka YiLi nie wykrywała ATP poniżej 5 nM. Wszystkie wymazówki wykrywały stężenia ATP od 5 000 nM do 5 nM (rysunek 1).

Rysunek 1. Oznaczanie czystego analitu ATP

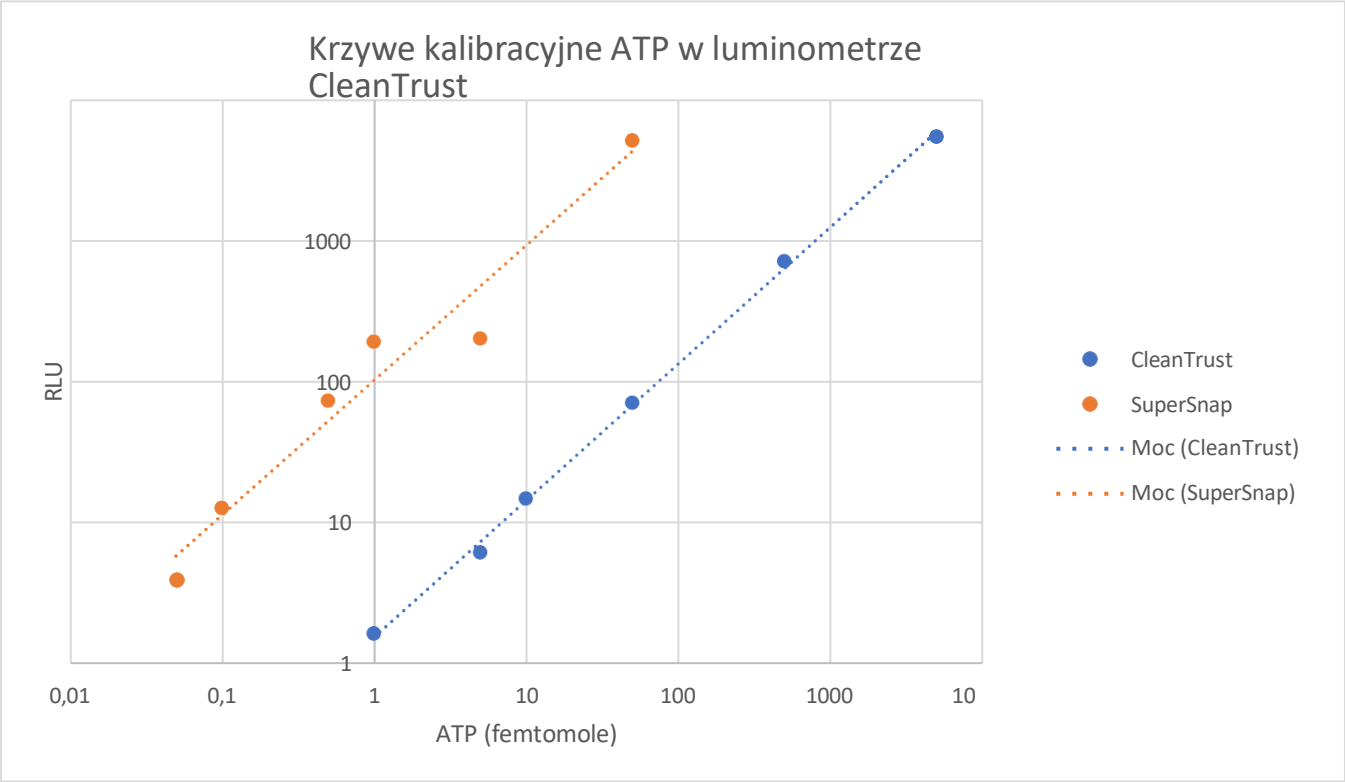


*Pomarańczowa linia wskazuje wartość „niepowodzenia” – RLU powyżej tego progu uznaje się za wynik pozytywny dla ATP
#Zielona linia wskazuje wartość „pozytywną” – wyniki RLU poniżej tego progu uznaje się za negatywne pod względem ATP (poniżej granicy wykrywalności (LoD))

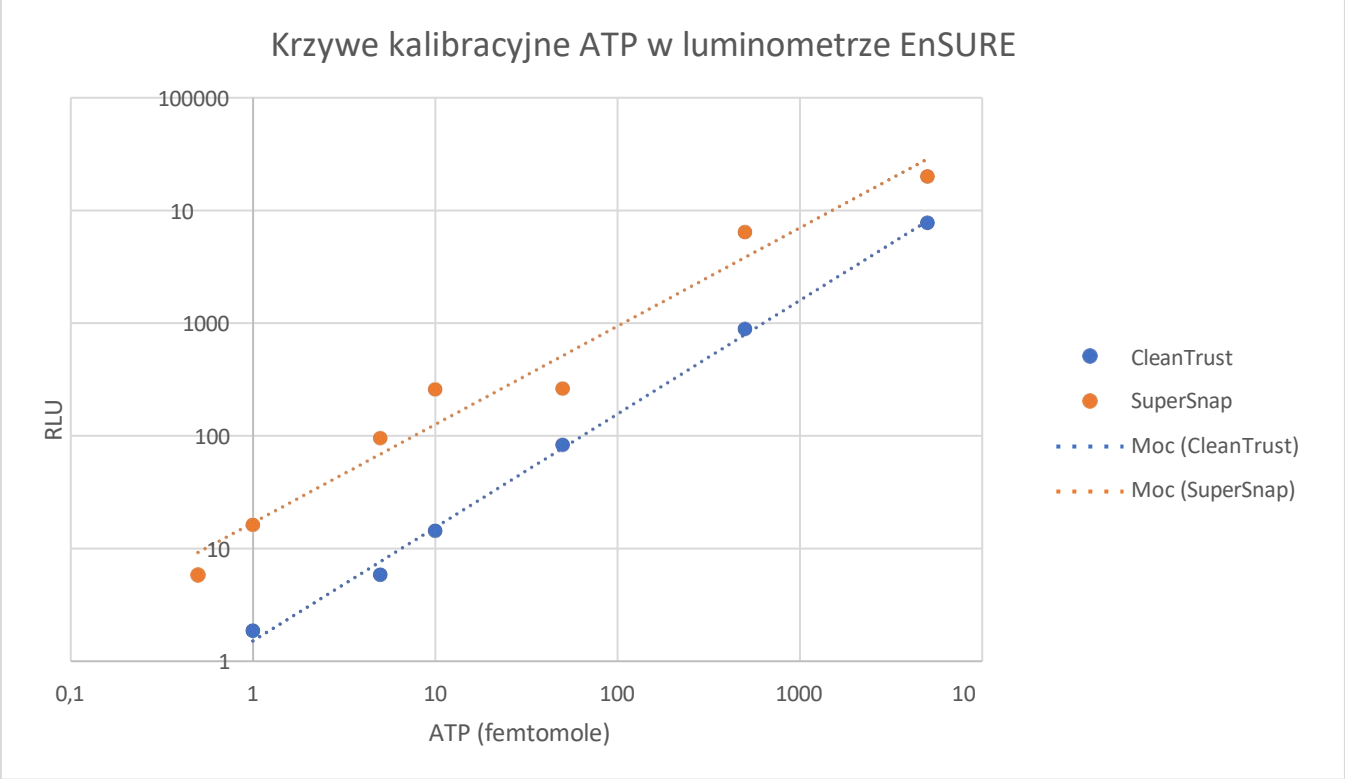
Po przeprowadzeniu dalszej analizy porównanie wydajności wymazówek CleanTrust (YiLi) i Hygiena SuperSnap, szczególnie przy niskich poziomach analitu (ATP), wykazało, że urządzenie SuperSnap cechuje wyższa czułość w wykrywaniu ATP w porównaniu z wymazówkami CleanTrust (rysunki 2a i b). Zjawisko to zaobserwowano niezależnie od tego, jaki luminometr został użyty do odczytu wartości RLU. To ponownie potwierdziło większą czułość wykrywania ATP przy użyciu wymazówek Hygiena.

Rysunek 2. Porównanie czułości wykrywania czystego analitu ATP – SuperSnap a CleanTrust

a. Korzystanie z luminometru CleanTrust



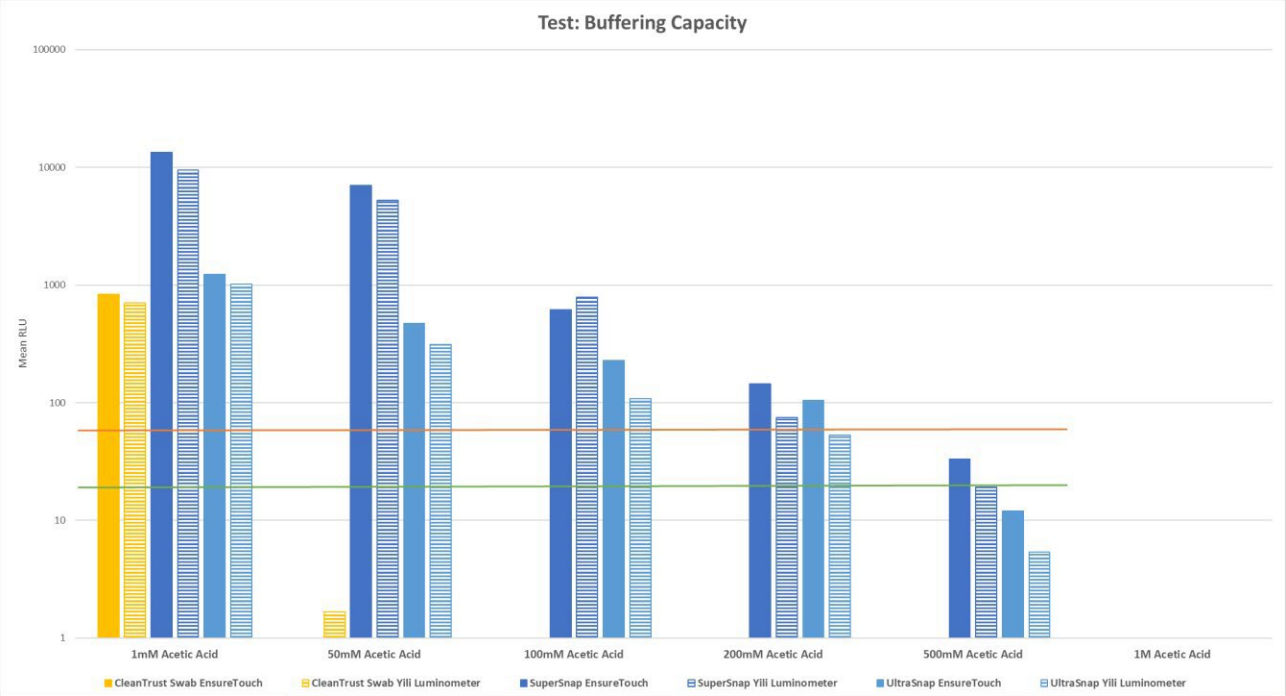
b. Korzystanie z luminometru EnSURE Touch



Określenie zdolności buforowej

Wymazówki Hygiena SuperSnap i UltraSnap skutecznie buforowały roztwory kwasowe o stężeniu do 500 nM, wykazując lepszą wydajność w porównaniu z wymazówkami YiLi CleanTrust. Zdolność buforująca wymazówek CleanTrust zaczęła zawodzić w zakresie stężeń kwasu octowego od 1 nM do 50 nM. W przypadku wymazówek CleanTrust skoki stężenia ATP można było wykryć jedynie po poddaniu ich działaniu 1 mM kwasu octowego; przy wyższych stężeniach kwasu (molarnościach) wymazówka generowała wyniki fałszywie ujemne, nie będąc w stanie wykryć dodanego ATP. Natomiast w przypadku urządzeń firmy Hygiena urządzenie SuperSnap nadal wykrywało obecność 50 nM ATP w obecności 500 mM kwasu octowego, a urządzenie UltraSnap nadal wykazywało pozytywny wynik wykrywania ATP w obecności 200 mM kwasu octowego.

Rysunek 2. Wykrywanie ATP w środowiskach kwaśnych – demonstracja zdolności buforującej

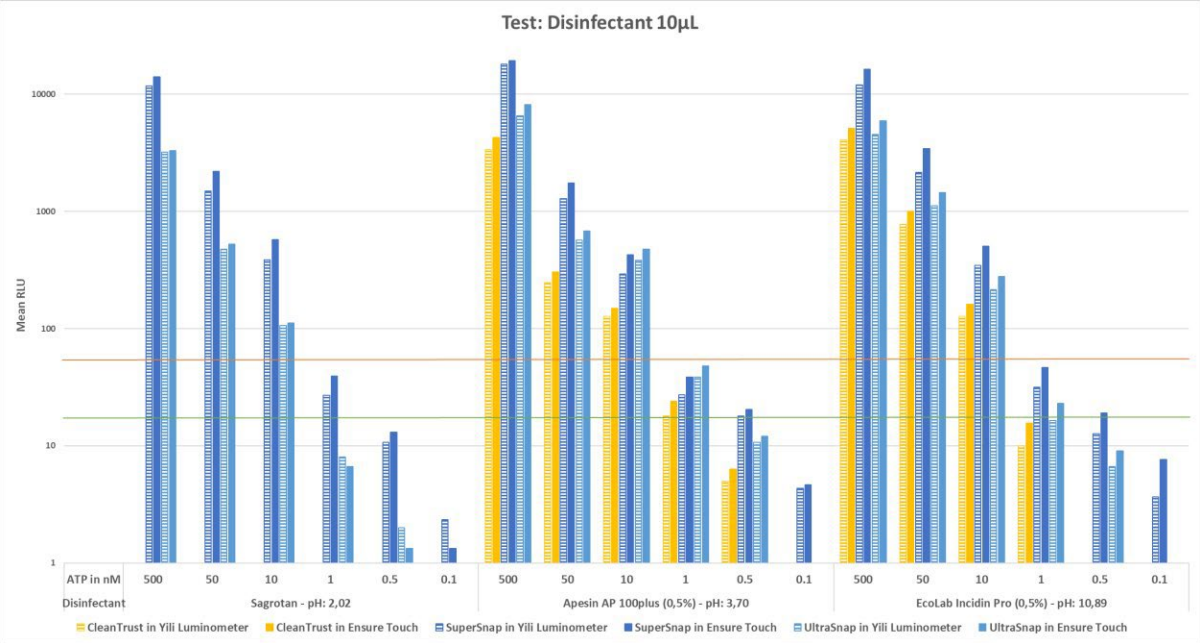


*Pomarańczowa linia wskazuje wartość „niepowodzenia” – wartości RLU powyżej tego progu uznaje się za dodatnie pod względem obecności ATP
#Zielona linia wskazuje wartość „pozytywną” – wartości RLU poniżej tego progu uznaje się za wynik negatywny dla ATP (poniżej LoD)

Odporność na środki dezynfekujące do powierzchni

Metody pomiaru ATP na powierzchniach firmy Hygiena, wykorzystujące wymazówki UltraSnap i/lub SuperSnap, pozwoliły z powodzeniem wykryć wszystkie stężenia ATP w obecności wszystkich trzech środków dezynfekujących (rys. 3). Wymazówka YiLi CleanTrust nie wykryła wszystkich stężeń ATP w obecności środka Sagrotan (pH 2). Ponadto test YiLi CleanTrust nie wykrył niskich stężeń ATP w obecności nieco mniej kwaśnego środka dezynfekującego Apesin (wartość pH 3,7) oraz środka zasadowego Incidin (wartość pH 10,9). W każdym pomiarze wartości RLU tej samej próbki są niższe w przypadku badania za pomocą systemu YiLi niż w przypadku systemu wykrywania ATP firmy Hygiena.

Rysunek 3. Wykrywanie ATP w obecności środków dezynfekujących



*Pomarańczowa linia wskazuje wartość „niepowodzenia” – wartości RLU powyżej tego progu uznaje się za wynik pozytywny pod względem obecności ATP
#Zielona linia wskazuje wartość „pozytywną” – wartości RLU poniżej tego progu uznaje się za wynik negatywny pod względem obecności ATP (poniżej LoD)

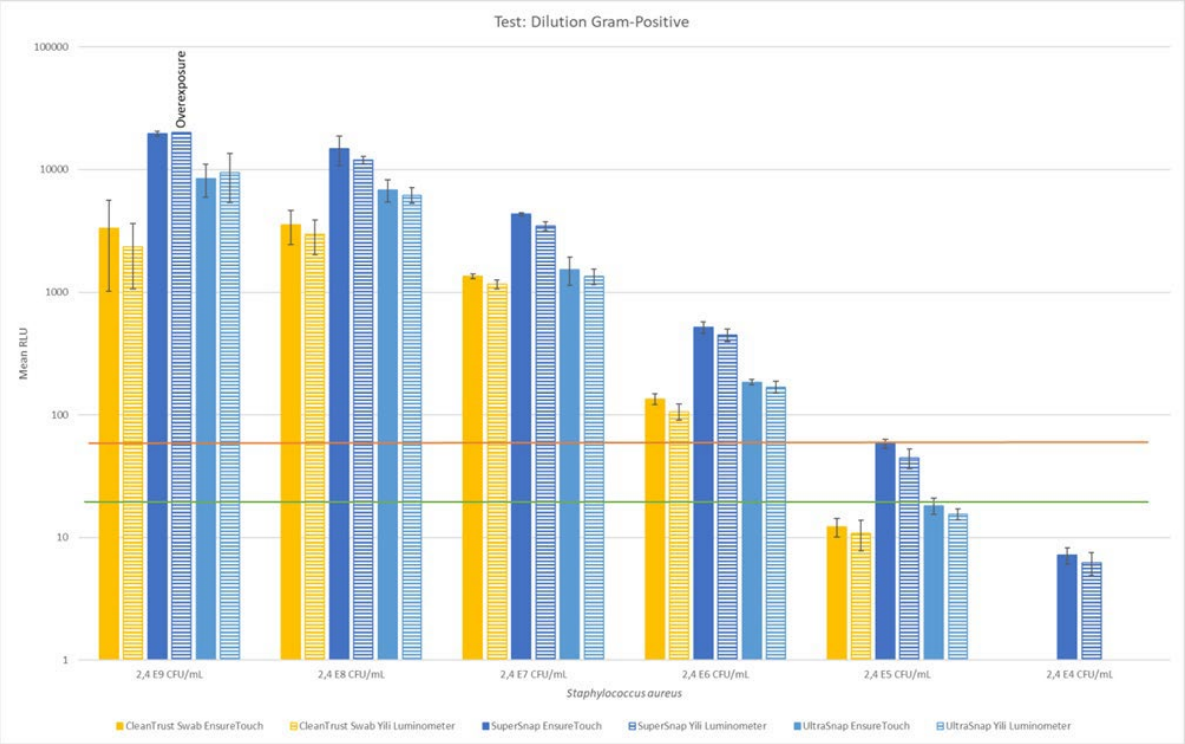
Czułość wykrywania mikroorganizmów

W przypadku wymazówek CleanTrust każdą wymazówkę mierzono trzykrotnie, na przemian w urządzeniach YiLi i Hygiena, zaczynając od urządzenia YiLi. (6 pomiarów w ciągu 1,5 minuty: na przemian: YiLi, Hygiena, YiLi, Hygiena, YiLi, Hygiena. W przypadku wymazówek SuperSnap i UltraSnap proces został odwrócony: najpierw Hygiena, potem YiLi itd.) Stężenia CFU określono poprzez posiew 100 µL każdego stopnia rozcieńczenia na płytkach TSA i SDA w trzech powtórzeniach.

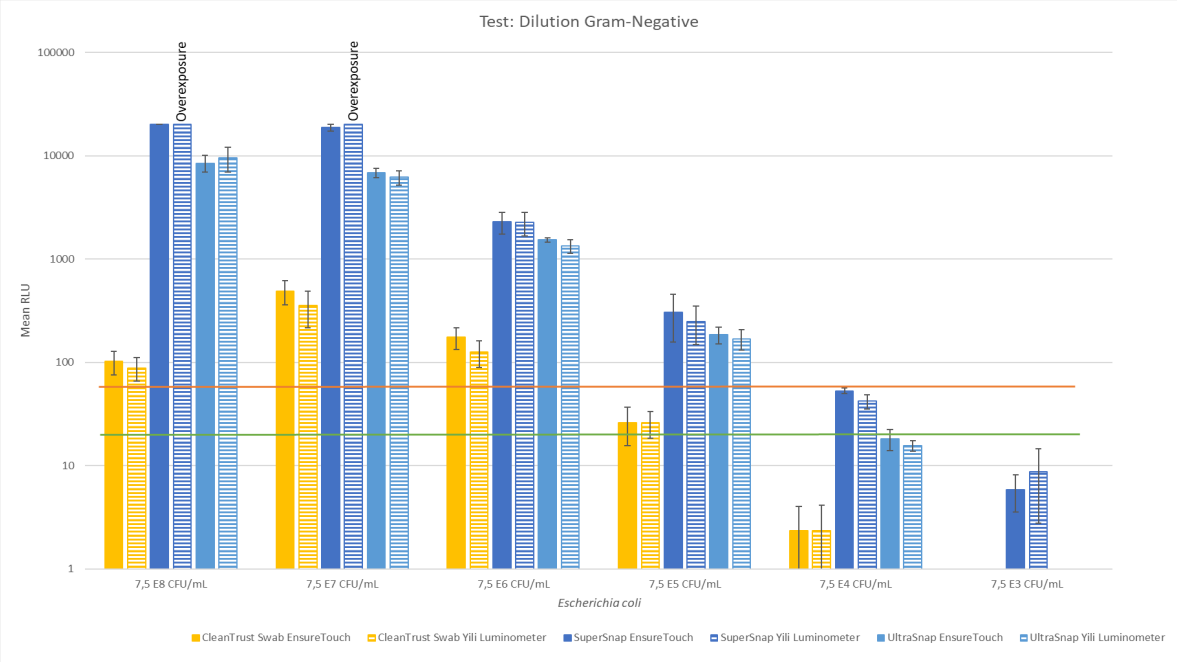
Jak pokazano na rysunku 4 (a–d), w przypadku wszystkich badanych organizmów wymazówki Hygiena SuperSnap i UltraSnap wykrywały organizmy z większą czułością niż wymazówka YiLi, zwłaszcza w przypadku *E. coli* i *S. cerevisiae*. Czułość wacików Hygiena SuperSnap jest średnio od 10 do 100 razy wyższa niż czułość wacików YiLi (mierzona w CFU/ml). Na przykład w przypadku wykrywania drożdży granica wykrywalności dla systemu YiLi wynosiła$^{10^6}$CFU/ml, a dla systemu Hygiena –$^{10^4}$CFU/ml. Można założyć, że bufory Hygiena umożliwiają lepsze rozbicie komórek. W połączeniu z bardziej czułą opcją pomiarową daje to lepsze wyniki dla systemu Hygiena we wszystkich pomiarach przeprowadzonych w celu wykrycia zanieczyszczeń.

Rysunek 4: Czułość wykrywania mikroorganizmów

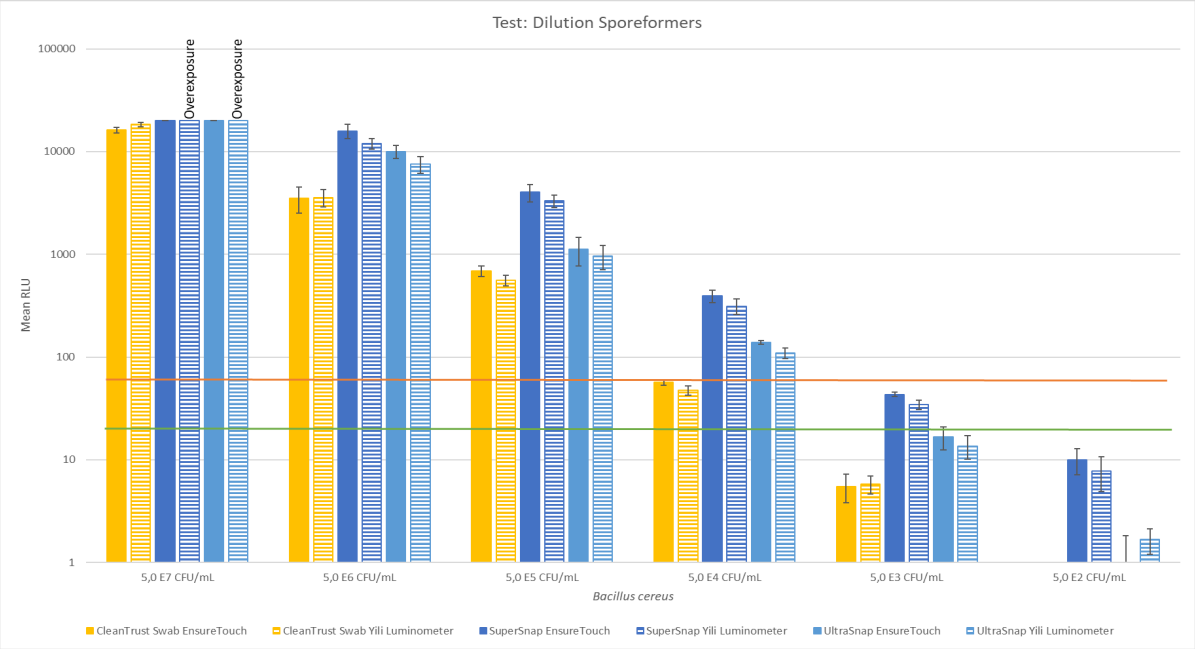
a. Organizmy Gram-dodatnie



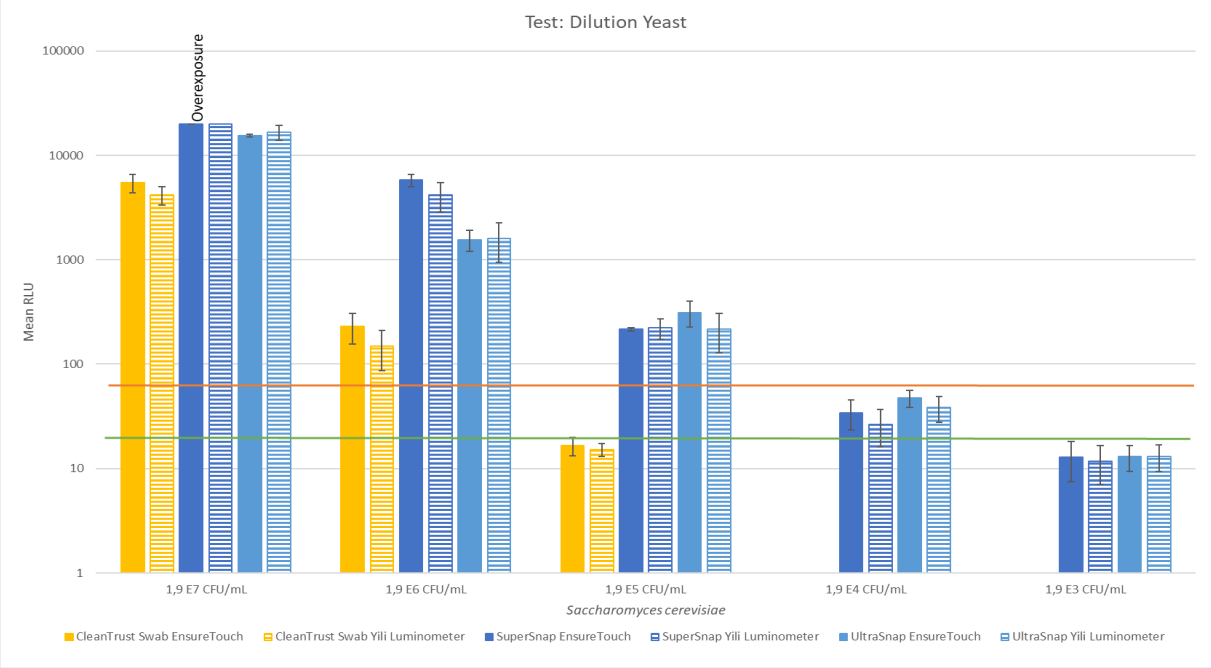
b. Organizmy Gram-ujemne



c. Organizmy tworzące przetrwalniki



d. Drożdże



Wnioski

W niniejszym badaniu wykazano wyższą skuteczność metod wykrywania ATP firmy Hygiena stosowanych na powierzchniach, z wykorzystaniem urządzeń SuperSnap i UltraSnap w połączeniu z luminometrem EnSURE Touch. SuperSnap okazał się najskuteczniejszym systemem do pobierania próbek ATP w celu wykrywania zanieczyszczeń, generując najwyższe wartości RLU we wszystkich testach, przewyższające wyniki uzyskane przy użyciu systemu YiLi. Na szczególną uwagę zasługuje doskonała wykrywalność mikroorganizmów chorobotwórczych oraz tolerancja na wysokie i niskie wartości pH w buforach, co ma szczególne znaczenie podczas czyszczenia powierzchni środkami dezynfekującymi w celu zapewnienia czystości. Badanie tych parametrów wykazało znacznie lepszą skuteczność i czułość w pomiarze ATP, zwłaszcza w przypadku wymazówki SuperSnap, a także wymazówki UltraSnap w połączeniu z luminometrem EnSURE Touch.

W kilku badaniach wykazano, że wymazówki YiLi dają wyniki fałszywie ujemne, zwłaszcza w przypadku dezynfekcji powierzchni środkami o wysokim lub niskim pH. Podczas testów z użyciem reprezentatywnego kwasu na wacikach YiLi skoki stężenia ATP można było wykryć jedynie po zastosowaniu 1 mM kwasu octowego; przy wyższych stężeniach kwasu (molarnościach) wacik generował wyniki fałszywie ujemne, nie wykrywając dodanego ATP. Natomiast w przypadku urządzeń firmy Hygiena wkładka SuperSnap nadal wykrywała obecność 50 nM ATP w obecności 500 mM kwasu octowego, a wymazówka UltraSnap nadal wykazywała pozytywny wynik wykrywania ATP w obecności 200 mM kwasu octowego. Ten sam efekt zaobserwowano w przypadku stosowania środków dezynfekujących o zarówno wysokich, jak i niskich wartościach pH.

Niezależnie od tego, czy testowano ATP, czy mikroorganizmy, wymazówki Hygiena generowały wyższe wartości RLU dla identycznych próbek. Wskazuje to, że SuperSnap i UltraSnap charakteryzują się wyższą czułością w pomiarze zarówno wolnego ATP, jak i ATP pochodzącego z mikroorganizmów, niezależnie od luminometru użytego do wykrywania, co potwierdza przewagę wydajnościową urządzeń Hygiena®.

Podsumowując, niniejsze badanie wykazuje, że system Hygiena przewyższa system YiLi pod względem czułości wykrywania zanieczyszczeń powierzchniowych, w tym mikroorganizmów, nawet w obecności pozostałości środków dezynfekujących.

Wyniki podsumowano w następujący sposób:

Tabela 1: Podsumowanie wyników wydajności

	Granica wykrywalności i wydajność		
Firma:	**Hygiena**		**YiLi**
Luminometr:	**EnSURE Touch**	**EnSURE Touch**	**YiLi**
Test:	**SuperSnap**	**UltraSnap**	**CleanTrust Surface**
Czułość: Wykrywanie ATP	**0,5 fmol ATP***	**1 fmol ATP**	5 fmol ATP
Czułość: wykrywanie organizmów Gram-dodatnich	**10^5 CFU/ml**	10^6 CFU/ml	10^6 CFU/ml
Czułość: wykrywanie drobnoustrojów Gram-ujemnych	**10^4 CFU/ml**	10^5 CFU/ml	10^5 CFU/ml
Czułość: Wykrywanie organizmów tworzących przetrwalniki	**10^3 CFU/mL**	10^4 CFU/ml	10^4 CFU/ml
Czułość: wykrywanie drożdży	**10^4 CFU/ml**	**10^4 CFU/ml**	10^6 CFU/ml
Granica zdolności buforowej	**500 mM kwasu octowego**	**200 mM kwasu octowego**	1 mM kwasu octowego
Wykrywanie ATP w obecności kwaśnego środka dezynfekującego (pH 2,02)	**1 fmol ATP**	**10 fmol ATP**	Brak wykrycia
Wykrywanie ATP w obecności kwaśnego środka dezynfekującego (pH 3,7)	**1 fmol ATP**	**1 fmol ATP**	10 fmol ATP
Wykrywanie ATP w obecności zasadowego środka dezynfekującego (pH 10,89)	**1 fmol ATP**	**1 fmol ATP**	10 fmol ATP

***Niebieski, pogrubiony tekst wskazuje na lepszą skuteczność w porównaniu z wacikami YiLi CleanTrust.**