

PRIMENA HY-LITE DETEKTORA ZA ISPITIVANJE HIGIJENE PROIZVODNIH LINIJA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Željko Maletić, Živko Bulajić, Sunčica Kocić-Tanackov

HY-LITE detektor se koristi za utvrđivanje prisustva ATP (adenozin trifosfata) na ispitivanim površinama. ATP se nalazi u svim životinjskim i biljnim ćelijama, i ćelijama mikroorganizama. Merenje nivoa ATP se može koristiti kao indikator higijene i čistoće radnih površina koje dolaze u kontakt sa hranom i mogu biti izvor kontaminacije. Princip detekcije se zasniva na bioluminiscenciji tj. merenju intenziteta oslobođene svetlosti.

Brisevi su uzimani sa 27 mesta, posle sanitacije CIP-om, u pogonu za proizvodnju majoneza i kečapa A.D. "Vital" Vrbas, tokom mesec dana. Uzeto je 250 uzoraka kontakt ploča agara i ATP briseva sa površine opreme. Nije zabeležen neusaglašen bris kontakt agarom sa površine 4x4 cm², čiji prosečni rezultat je veći od 1 cfu/cm². U pet slučajeva je detektovan nivo ATP-a iznad dozvoljenog (>200 Rlu), koji je bio preporučan za ovu granu industrije. Od ukupnog broja briseva uzetih HY-LITE -om: 69 % se kretao u nivou 50-100 Rlu, 21 % u nivou 100-150 Rlu, 8 % u nivou 150-200 Rlu i 2 % preko 200 Rlu. U slučaju vrednosti iznad 200 Rlu ponavlja se proces sanitacije linija za proizvodnju. U ispitivanjima nije zabeležena korelacija između klasičnog mikrobiološkog metoda otiska agarom i detekcije prisustva ATP-a.

ključne reči: HY-LITE, ATP, bioluminiscencija, otisak agarom

APPLICATION OF HY-LITE DETECTOR FOR DETECTOR FOR MEASURING HYGIENE IN FOOD INDUSTRY PROCESSING LINES

HY-LITE detector is used to track the presence of adenosine triphosphate (ATP) on working surfaces. ATP occurs in all living cells: animal, plant, and microorganism. The level of ATP is used as an indicator of hygiene and cleanliness of working surfaces in contact with food which are potentially capable to support microbial contamination. The detection principle is based on bioluminescence i.e. measuring the intensity of released light.

The working surfaces in the processing line for mayonnaise and ketchup production at A.D. "Vital", Vrbas were sampled during one month period. Swabs were taken from 27 spots, after sanitation with CIP. Total of 250 samples of contact agar plates and ATP swabs were collected from the equipment surface areas. No incompatible swab with contact agar taken from 4x4 cm² area with average count over 1 cfu/cm² was recorded. In five cases, higher levels of ATP (over 200 Rlu) than the limit were detected. The swabs taken with HY-LITE assay showed the following distribution: 69% (of total samples) was at the level 50-100 Rly, 21% at 100-150 Rlu, 8% at 150-200 Rlu and 2% at over 200 Rlu. In the case of samples that exceeded 200 Rlu, the sanitation of processing lines should be repeated. During investigation, no correlation was found between the traditional microbiological method using agar contact plate and the ATP assay.

Key words: HY-LITE, ATP, bioluminescence, agar contact plate.

UVOD

Sanitacija pogona je bitan deo dobre proizvođačke prakse GMP (Good Manufacture Practies) i predstavlja kombinaciju svih postupaka u proizvodnji hrane i kontrolu kvaliteta sa ciljem da se osigura dobijanje zdravstveno bezbednog proizvoda. Poštovanje dobre higijenske prakse GHP (Good Hygiene Practices) u fabrikama prehrambene industrije neophodno je radi preduzimanja svih mera koje omogućuju da se količina neusaglašenog proizvoda (škarta) svede na minimum i spreči narušavanje zdravlja kupca (1). Jedan od važnih vidova mikrobiološke kontrole je monitoring higijene procesnih mašina posle upotrebe CIP-a.

Higijena kritičnih tačaka u proizvodnji hrane, mora se redovno proveravati pre početka proizvodnje. Mikrobiološki monitoring higijene mašina posle pranja u prehrambenoj industriji može se vršiti:

- standardnim mikrobiološkim metodama kao što je kontaktno uzimanje otiska hranjivim agarom sa ravnih površina i uzimanje brisa sa teško dostupnih mesta na opremi sa otvora cevi, brizgaljki, termoizmenjivača, itd., vreme trajanja analize 24 do 48 sati,
- brzim metodama baziranim na merenju ATP-bioluminiscencije, gotovi rezultati se dobijaju za 1-2 minuta.

Kod standardnih metoda nakon uzimanja otiska ili brisa opreme, ne postoji trenutna korektivna mera tj. proizvodnja se pokreće, a rezultati stižu posle 24 do 48 sati. Ukoliko sanitacija nije adekvatno urađena može doći do kontaminacije proizvoda. Brzim merenjem ATP-bioluminiscencije u slučaju neadekvatnog pranja, može se u realnom vremenu izvršiti korekcija i ponoviti sanitacija čime se uklanja rizik po bezbednost proizvodnje.

Na tržištu postije dve generacije bioluminiscentnih detektora (slika 1, 2, 3):

I. generacije koji detektuju ukupnu ATP (HY-LITE, Lumitester pd-10, firefly-2, UNI-LITE, ultrasnap i SystemSURE II, LUMAC Biocounter-om i dr.). Ograničenja ovog sistema su da ne mogu razlikovati ATP bakterijskog porekla od nebakterijskog. Međutim, detekcija prisustva ukupne ATP je značajna zato što i nebakterijska ATP (organski supstrat) može biti izvor hranjivih materija za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Takođe, zaostala sanitarna sredstva koja se koriste u pranju proizvodnih linija utiču na reakciju luciferin/luciferaza smanjujući stvarni nivo luminiscencije. Ovi nedostaci mogu da dovedu do lažnih pozitivnih ili negativnih rezultata. Međutim kod poslednjih generacija detektora i upotrebom posebnih briseva i pufera ovi nedostaci su otklonjeni.

II. generacije u mogućnosti su da identifikuju isključivo bakterijsku ATP (Bioluminometer PROFILE®, (slika 3), CellScan™, Mikroluminometar (Model 3550i), i dr.). Ovaj aparat ima mogućnost detekcije niskog broja bakterija (ne ATP-a), razlikuje bakterijsku od somatske ćelije, kvasce od bakterija i može otkloniti uticaj stranih supstanci koje su prisutne u uzorku. Aparat detektuje samo ATP živih mikroorganizama. Rezultati se očitavaju na LCD ekranu u Rlu. Aparat su testirali USDA, Agriculture Canada, DOD, University of Michigan i potvrdili izuzetnu korelaciju između ove metode i standardne metode uzimanja briseva..



Slika 1. Lumitester pd-10



Slika 2. Firefly-2



Slika 3. Bioluminometer PROFILE®

Na našem tržištu još ne postoji detektor samo za detekciju bakterijske ATP. U A.D. "Vital" je u upotrebi detektor HY-LITE (Slika 5) koji je prve generacije i ne razlikuje bakterijsku od nebakterijske ATP.

Cilj ovog rada je bio da se ispita mogućnost primene HY-LITE uređaja, Merk za ispitivanje higijene proizvodnih linija kečapa i majoneza u industriji ulja A.D."Vital", Vrbas.

MATERIJAL I METODE

Uzorci ATP briseva i otisci agarom su uzimani sa 27 mesta (posude za doziranje, stolovi za doziranje, poklopci tankova, ventili tankova, poklopci prihvatnih sudova), posle sanitacije CIP-om, u pogonu za proizvodnju majoneza i kečapa A.D."Vital", tokom mesec dana. Uzeto je 250 uzoraka kontakt agarom i ATP briseva sa ravne površine opreme.

Otisak agarom (Contact plate-bioMérieux) komplet sadrži nosač sa vremenskim tajmerom koji reaguje na pritisak i ploče sa agarom koja je površine 4×4 cm² (Slika 4). Aplikator standardizuje testiranje vršeci pritisak od 500 g tokom 10 sekundi (European Committee for Standardization: CEN/TC 243) (2). Metoda je kvantitativna, rezultat se očitava u cfu/ cm².



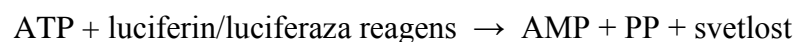
Slika 4. Contact plate (bioMérieux)



Slika 5. HY-LITE (Merck)

Za detekciju ATP-a je korišćen HY-LITE (Merck) aparat prve generacije (Slika 5) sa brisom (pen) za kontrolu radnih površina.

Princip detekcije se zasniva na bioluminiscenciji tj. merenju intenziteta oslobođene svetlosti.



Do emitovanja svetlosti dolazi kada se flavin pigment luciferin oksidiše u prisustvu enzima luciferaze i ATP-a, koji može biti bakterijski ali i drugog organskog porekla. Preciznim merenjem svetlosti koja se ispušta u ovoj reakciji, detektorom se tačno određuje količina pristunog ATP. Intenzitet svetla koji se emitovao iz uzorka se pojavljuje na displeju u svetlosnim jedinicama (Rlu) ili \log_{10} (Rlu). Vrednost (Rlu) je proporcionalna količini ATP u testiranom uzorku te je prema tome direktno proporcionalna sa kontaminacijom biološkog materijala. Metoda je u skladu sa Evropskom direktivom: 93/43/EEC (1) koja se odnosi na korišćenje brzih metoda za monitoring higijene. Nivo Rlu za svaku granu industrije je dat od strane proizvođača (www.merck.com/manual) (3).

Tabela 1. Predloženi limiti od strane proizvođača (www.merck.com/manual)

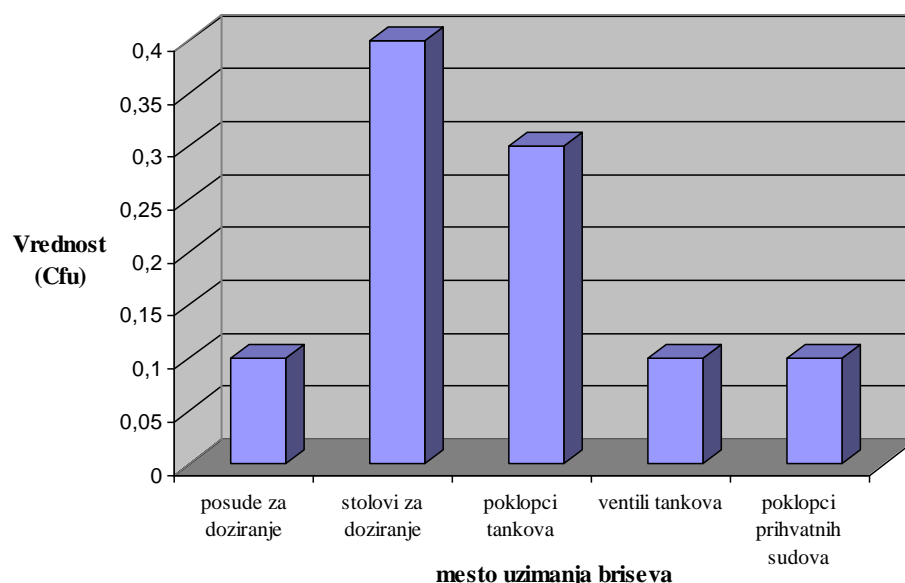
Table 1. Recommended limits by manufacturer

Proizvodnja	Zadovoljava	Nezadovoljava
Sveže mleko	100	300
Sveže meso/riba/jaja	300	1000
Sveže povrće/voće	500	1500
Prerađeno mleko i mlečni proizvodi	70	200
Prerađeno meso riba/jaja	70	200
Prerađeno povrće/voće	200	600
Ketering (avionski ketering)	500	1500
Bezalkoholni napitci (izuzev soka)	30	100
Fermentisani napitci	30	100

Limiti se određuju na osnovu HY-LITE rezultata posle rutinskog čišćenja opreme. Iskustva pokazuju da je dobro napraviti najmanje 40-50 merenja na izabranim očišćenim mestima i rangirati ih prema izmerenim vrednostima. Srednja vrednost ove liste (a ne prosečna vrednost) uzima se kao limit koji zadovoljava.

REZULTATI I DISKUSIJA

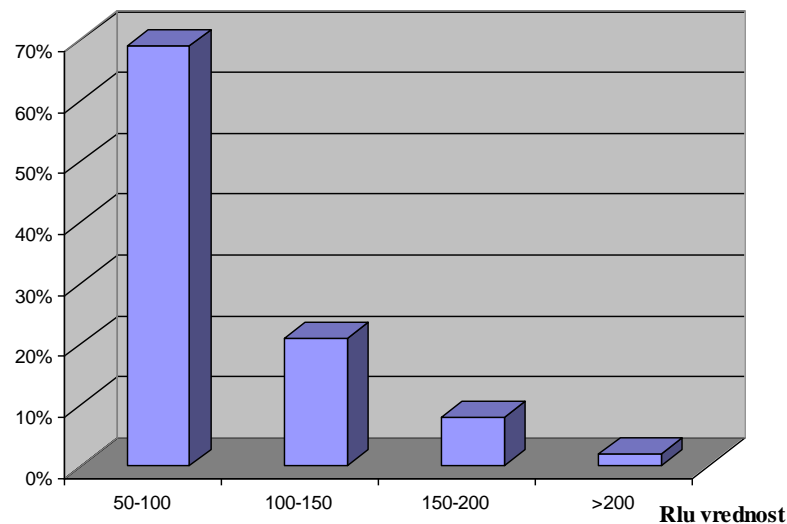
Ispitivanjem nije zabeležen neusaglašen bris kontakt agarom sa površine $4 \times 4 \text{ cm}^2$, čiji je prosečni rezultat bio veći od 1 cfu/cm^2 .



Slika 6. Prosečne vrednosti cfu/cm² na mestima uzimanja briseva
Figure 6. Average counts (cfu/cm²) at swab spots

Najveće vrednosti cfu/cm² su zabeležene na stolovima za doziranje 0,4, a najmanje na posudama za doziranje, ventilima tankova i poklopcima prihvatnih stolova sa vrednostima 0,1 cfu/cm² (Slika 6). Stolove za doziranje nije moguće prati Cip-om, takođe su izloženi spoljašnjoj sredini i manipulaciji od strane zaposlenih, čime se mogu objasniti viši cfu/cm² od ostalih mesta koja su uzorkovana. Poklopci tankova se nalaze iznad kugli Cip-a koje služe za pranje i mlaznice nisu uvek u stanju da ravnomerno rasporede vodu i sredstva za pranje po čitavoj unutrašnjosti tanka. Prihvatni sudovi na mašini su zapreminski manji od tankova i pod istim režimom sanitacije, se bolje peru. Isto važi i u slučaju ventila koji su izloženi najvećem protoku medijuma za pranje i pritisku. Posudama za doziranje se odmeravaju konzervansi, emulgatori i arome koje su besprekornog mikrobiološkog kvaliteta uz dodatno pranje posle svakog doziranja imaju malu vrednost cfu/cm².

Od ukupnog broja briseva uzetih HY-LITE -om: 69 % se kretao u nivou 50-100 Rlu, 21 % u nivou 100-150 Rlu, 8 % u nivou 150-200 Rlu i 2 % preko 200 Rlu (Slika 7).



Slika 7. Procentualni udeo vrednosti Rlu u ispitivanjima
Figure 7. Distribution of Rlu values obtained in the investigation

U ispitivanjima nije zabeležena korelacija između klasičnog mikrobiološkog metoda otiska agarom i detekcije prisustva ATP-a. Rezultati se mogu objasniti, kao što je ranije navedeno, time da je HY-LITE aparat I generacije i detektuje ukupnu ATP koja ne mora biti vezana samo za žive ćelije. Dok se mikrobiološki metodi se zasnivaju na utvrđivanju prisustva živih ćelija organizama. Detekcija ukupne ATP kod HY-LITE aparata nije ograničavajući faktor za korišćenje u monitoringu higijene linija posle pranja, jer ostatci organske materije mogu poslužiti kao izvor hranjivih materija za rast mikroorganizama.

Baumgart (1996) (4) je proučavao faktore koji značajno utiču na kvalitet pranja i dezinfekcije. Uporedna studija je izvedena na sekačima za meso. Ukupan broj aerobnih bakterija je utvrđen uzimanjem briseva. ATP nivo je beležen HY-LITE sistemom. Utvrđena je visoka vrednost ATP-a, dok rast bakterija nije utvrđen ili je bio nizak, što se podudara sa rezultatima u našem ispitivanju. Prema autorima ovakvi rezultati se objašnjavaju nepravilnom površinom sa koje je bris uzet. Stoga autori sugerišu da je tekstura površine signifikantan

faktor koji utiče na detekciju nivoa ATP-a. Drugačiji rezultati su dobijeni u ispitivanju koje su izvršili Guðbjörnsdóttir i Einarsson (1998) (5). Testirana je efikasnost sanitacije opreme. Upoređivani su klasični metod uzimanja briseva i brisevi uzeti sa LUMAC Biocounter-om. Brisevi su uzeti sa 64 mesta jedan pored drugog u fabrici za preradu ribe. Dobijen je visoki koeficijent korelacije. Neslaganje sa gore navedenim podacima se može objasniti time da nije vršena inokulacija opreme mikroorganizmima, a u drugom slučaju izvršena, pa je praćeno stanje poslije sanitacije.

Korišćenjem novih detektora koji razlikuju bakterijsku ATP od nebakterijske dobija se veći stepen korelacije. New Horizons Diagnostics (NHD, Columbia, Maryland) su razvili takvu tehniku. Ručni Mikroluminometar (Model 3550i) je korišten u tu svrhu. Bakterijska ATP je izražavana u Rlu jedinicama. Postoji visoka korelacija između Rlu i cfu/cm². Studija za procenu validnosti metoda je izvršena na preko 1000 uzoraka govedine, svinjetine i piletine od strane istraživača ministarstva poljoprivrede SAD-a (United States Department of Agriculture) u poređenju sa klasičnom metodom briseva. Dobijena je visoka korelacija ($r = 0,92$) između broja bakterijskih kolonija i detektovanog nivoa ATP-a (6, 7, 8).

Predmet studije koju su izveli Holzapfel i sar., (2004) (9) je bio da se utvrdi korelacija između ukupnog broja kolonija čistih bakterijskih kultura (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus johnsonii*) i Rlu vrednosti dobijene bioluminiscentnim metodom. Korišćen je instrument CellScanTM koji razlikuje slobodnu i vezanu ATP, uključujući i bakterijsku. Prema autorima, ovaj sistem je dao odlične rezultate u korelaciji između vrednosti ATP-a i broja kolonija čistih bakterijskih kultura. Međutim pri vrednostima većim od 10⁴ cfu/ml došlo je do većeg variranja rezultata na instrumentu. Ovaj metod merenja ATP-a nije mogao da razlikuje bakterijsku od kontaminacije nastale od ostataka proizvoda.

ATP metod brže obezbeđuje rezultate koji se mogu trenutno iskoristiti za poboljšanje higijene površina i za preventivno održavanje pogona prehrambene industrije (10, 11). ATP metod je senzitivniji za uočavanje razlika u procesu pranja opreme nego standardna mikrobiološka metoda briseva (12).

ZAKLJUČAK

ATP bioluminiscencija ima potencijal da bude korisno i efikasno oruđe u procenivanju efikasnosti procedura, po kojima se vrši pranje i sanitacija proizvodnih linija u prehrambenoj industriji. Ovaj metod je efikasniji i brži u procenivanju higijene linija posle pranja nego uzimanje briseva i klasična mikrobiološka analiza. Prilikom uvođenja ove metode bitno je pravilno proceniti gornju granicu vrednosti Rlu uzimanjem većeg broja briseva sa određene površine. Vrednost Rlu se određuje posebno za svaku granu prehrambene industrije u zavisnosti od sirovine koja se prerađuje. Sa brisevima se mora pažljivo rukovati da bi se izbegla spoljašnja kontaminacija koja daje visoke vrednosti Rlu.

Prisustvo raznih soli, metala ili drugih hemikalija mogu predstavljati potencijalni problem u pogrešnom tumačenju rezultata lažno pozitivnih ili negativnih rezultata.

Iskustva u A.D. "Vital" pokazuju da je na početku korišćenja navedenog sistema bio veliki broj neusaglašenih briseva i ponovljenih pranja, što je dovelo do nepoverenja u pouzdanost metode. Međutim tokom vremena broj neusaglašenih briseva i ponovljenih pranja se smanjivao, jer je ponavljanje postupka pranja zahtevalo dodatno radno angažovanje osoblja, zbog čega su bili motivisani da odmah posao korektno obave.

Zbog brzog dobijanja rezultata (2-3 minuta) ovaj metod daje dobre rezultate za monitoring prisustva mikroorganizama ili ostataka proizvoda nakon pranja u implementaciji HACCP sistema i sprečavanju kontaminacije hrane. Međutim ATP-metod nije zamena za klasične metode, kombinacijom navedenih metoda postižu se najbolji rezultati.

LITERATURA

1. EU Concil Directive on the hygiene of foodstuffs: 93/43/EEC
2. European Committee for Standardization: CEN/TC 243
3. www.merck.com/manual
4. Baumgart, J. Hygiene monitoring by ATP – determination with the HY-LITE (TM) system. *Fleischwirtschaft*, 76: 272–273 (1996).
5. Guðbjörnsdóttir, B., H. Einarsson, Evaluation of cleanliness by Adenosine triphosphate bioluminescent assay, *Skýrsla Rf /IFL report 9-98 Útgáfudagur Nordisk Industrifond, Rannsóknarráð Íslands, Íslenskar* (1998).
6. Siragusa, G.R., C. N. Cutter, W.J. Dorsa, M. Koohmaraie, Use of a rapid microbial ATP bio- luminescence assay to detect contamination on beef and pork carcasses. *J. Food Protec.* 58(7): 770-775 (1995).
7. Siragusa, G.R., C. N. Cutter, W. J. Dorsa, M. Koohmaraie, L. J. Perino, Use of a newly developed rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect microbial contamination on poultry carcasses. *J. Biolumin. Chemilumin.* 11: 297-301(1996).
8. Cutter, C.N., W. J. Dorsa, G. R. Siragusa, A rapid microbial ATP bioluminescence assay for meat carcasses. *Dairy, Food & Environ. San.* 16(11) p. 726-736 (1996).
9. Holzapfel, W. H., B. Becker, J. Fechler, Hygiene- and cleaning control in the food chain with the ATP bioluminescence method. *Institut für Hygiene und Toxikologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung.*, 84:121-124 (2004).
10. Griffiths, M. W., Applications of bioluminescence in the dairy industry. *J. Dairy Sci.* 76: 3118-3125 (1993).
11. Aycicek, H., U. Oguz, K. Karci, Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *Int. J. of Hygiene and Environmental Health*, 209: 203-206 (2006).
12. Reinemann, D.J., P. L. Rugg, An Investigation Of ATP Bioluminescence And Quantitative Bulk Tank Cultures To Assess Cleanliness Of Milking Machines. Paper No. 003009. *ASAE Ann. Int. Meet., Milwaukee, Wisconsin, July 10-13* (2000).