



Titill / Title	<i>Mat á þrifum með ATP-mæli (LUMAC Biocounter M 1500 Light)</i> <i>Evaluation of cleanliness by Adenosine triphosphate bioluminescent assay</i>		
Höfundur / Author	<i>Birna Guðbjörnsdóttir og Hjörleifur Einarsson</i>		
Skýrsla Rf / IFL report	9-98	Útgáfudagur / Date:	24.02.98
Verknr. / project no.	1087		
Styrktaraðilar / funding:	<i>Nordisk Industrifond, Rannsóknarráð Íslands, Íslenskar sjávarafurðir og Sölumiðstöð hraðfrystihúsanna</i>		
Ágrip á íslensku:	<p><i>ATP er orkuefni sem finnst í öllum lifandi frumum, bæði örverufrumum og vöðvafrumum og því hægt að nota til að mæla mengun. Mæling á ATP (adenosine triphosphate) með LUMAC Biocounter M 1500 Light ljósmæli var prófuð til að meta árangur þrifa.</i></p> <p><i>ATP-mæling var borin saman við hefðbundna penslun samkvæmt aðferðabók Rf. Penslaðir voru 64 staðir í fiskvinnsluhúsi. Góð fylgni ($r = 0,801$) fékkst þrátt fyrir að aldrei var nákvæmlega sama sýnið mælt með báðum aðferðum. Helsti munur á þessum tveim mælingum er að ATP - mæling mælir öll óhreinindi sem eru til staðar, bæði örverur og vöðvafrumur (fiskleifar). Ef menn gefa sér að góð þrif fjarlægji allar frumur af yfirborði þeirra flata sem hreinsa á, er hægt að taka stroksýni af yfirborðinu og leggja mat á þrifin með því að mæla hvort ATP finnst. Niðurstöður ATP - mælinga fást innan mínútu og er því hægt að grípa strax inn í ef upp koma vandamál og þrifa betur áður en vinnsla hefst. Niðurstöður úr hefðbundnum mælingum fást ekki fyrr en eftir tvo daga.</i></p> <p><i>Kostur ATP - mælingar er augljós sem hluti af HACCP kerfi matvælaframleiðenda og getur virkað sem hvatning fyrir starfsfólk sem vinnur við þrif ef það fær að sjá hvernig tekst til með þrifin og jafnvel að mæla sjálf. Ómetanleg er sú staðreynd að hægt er að endurtaka þrif strax eftir mælingu, þannig að þrifin ættu að vera í góðu lagi þegar vinnslan hefst. Annar augljós kostur er að kostnaður vegna ATP-mælinga er aðeins fjórðungur af kostnaði við hefðbundna penslun.</i></p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>ATP-ljósmæling, þrif.</i>		
Summary in English:	<p><i>Measurement of ATP (adenosine-5-triphosphate) with LUMAC Biocounter M 1500 Light photometer was tested to evaluate the efficiency of cleaning methods. Measurement of ATP was compared to the conventional swab method. ATP is an energy source of any living cells, both microbial and non-microbial. Altogether, 64 places in a fish processing plant were swabbed and ATP measurements done at the same time near the place of swabbing. Obtained correlation coefficient was $r = 0.801$. The main difference on these two methods is that measurement of ATP evaluates "total dirt" while the swab method only evaluates living microbes. If one assumes that an efficient cleaning method removes all dirt from surfaces, an ATP measurement can evaluate the success of cleaning. Results from ATP measurements can be obtained within a minute from sampling. Thus, one can act immediately if unsatisfactory results are obtained. Results from conventional methods take up to two days to obtain. The advantage of ATP measurements within a HACCP system in food processing plants is obvious. They can encourage the staff to do better with regard to cleaning. It is of great importance that further cleaning can be done immediately after measurement if required before a new working day. Furthermore, the cost of measuring ATP is only about a quarter to the cost of doing the swab method.</i></p>		
English keywords:	<i>ATP-bioluminescence, hygiene control</i>		

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR.....	3
2. FRAMKVÆMD.....	4
3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR	5
HEIMILDIR.....	7
Viðauki 1. Niðurstöður mælinga	9
Viðauki 2. Útreikningar á fylgni.....	10

1. INNGANGUR

Matvælaíðnaður og neytendur leggja sífellt meiri áherslu á öryggi og heilnæmi matvæla. Til þess að tryggja það, þarf að nota einhvers konar eftirlitskerfi og stjórnkerfi. HACCP - (Hazard Analysis Critical Control Point) er eitt slíkt kerfi. Til að hafa stjórn á hættu á mikilvægum stjórnstöðvum þurfa að vera til fljótvirkar og öruggar aðferðir til að greina hættuna. Þar sem þrif eru einn þáttur sem hægt er að stjórna til að koma í veg fyrir eða draga úr mengun af völdum örvera, en mengun af völdum örvera er ein hættan sem kemur fyrir aftur og aftur, er mjög mikilvægt að hægt sé að meta árangur þeirra á fljótvirkan og öruggan hátt. Sjónmat eitt og sér er gott eins langt og það nær og ætti að vera meira notað og þá kerfisbundið en það nær ekki að meta þau ósýnilegu óhreinindi (örverur) sem geta verið til staðar þó að flötur virðist vera hreinn. ATP-mæling er ein af þeim aðferðum sem hægt er nota til að meta þrif. Penslun til að greina örverur hefur verið notað til að meta árangur þrifa. Þessar aðferð eru seinvirk. ATP-mæling er hins vegar fljótleg aðferð sem tillölulega auðvelt er að nota, en nauðsynlegt er að staðla hana fyrir það umhverfi sem verið er að meta.

ATP-mæling var borin saman við hefðbundna Rf penslun til að meta árangur þrifa.

Helsti munur á þessum tveim mælingum er að ATP-mæling greinir öll óhreinindi sem eru til staðar, bæði örverur og vöðvafrumur (fiskleifar). Ef menn gefa sér að góð þrif fjarlægji allar frumur af yfirborði þeirra flata sem hreinsa á, er hægt að taka stroksýni af yfirborðinu og leggja mat á þrifin með því að mæla hvort ATP finnst. Niðurstöður ATP - mælinga fást innan mínútu og er því hægt að grípa strax inn í ef upp koma vandamál og þrifa betur áður en vinnsla hefst. Niðurstöður úr hefðbundnum mælingum fást ekki fyrir en eftir tvo daga. Þar sem að ATP-mæling nemur allt ATP, bæði frá örverum og öðrum óhreinindum, er hún mjög vel til þess fallin að meta árangur þrifa. Þessi aðferð er því tilvalin sem hluti af HACCP-kerfi.

2. FRAMKVÆMD

Þrif voru metin með ATP-mælingu, og voru sýni tekin eftir þrif áður en vinnsla hófst og borin saman við örverutalningu eftir hefðbundna penslun.

Notaður var LUMAC Biocounter M 1500 Light ljósmælir og LUMAC hygiene monitoring QM kit.

Prófefnin samanstóðu af luciferin-luciferasa blöndu (LUMIT-PM), nucleotide-releasing agent fyrir frumurnar (NRM) og LUMACULT til að bleyta í penslinum.

Prófefni voru geymd og meðhöndluð samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda.

Sýni voru tekin á u. þ. b. 20 stöðum í fiskvinnsluhúsi í þremur ferðum.

Alls voru penslaðir 64 staðir í fiskvinnsluhúsi. Öll sýni voru mæld innan klukkustundar frá sýnatöku.

Penslun.

Hefðbundin Rf aðferð var notuð við penslunina og líftala ákvörðuð efir henni. Þá var 50 cm² ramma var dýft í spritt og síðan brenndur til að dauðhreinsa (alltaf gert á milli sýna). Ramminn var síðan lagður á þann flöt sem pensla átti. Dauðhreinsuðum pensli var dýft í D/E neutralizing broth til að bleyta í honum. Penslinum síðan rúllað eftir fletinum innan rammans sex-sjö sinnum þversum og langsum. Penslinum síðan stungið ofan í dauðhreinsað glas og brotinn þannig að bómullarhnoðrinn fari ofan í glasið. Fimm ml af þynningarvatni var bætt í. Síðan er sýninu pípetterað á skálar með PCA með 0,5% NaCl (plate count agar-Difco) og skálarnar ræktaðar við 22°C í þrjá daga og þá lesið af.

ATP-mæling.

Dauðhreinsuðum pensli var dýft í LUMACULT-vökva til að bleyta í honum. Penslinum var síðan rúllað eftir 10 cm² svæði. Pinninn var síðan settur í kúvettu (lumacuvette) sem inniheldur 200µl NRM (vökvi sem losar um ATP úr frumunni til að hægt sé að mæla það) og brotinn 5 cm frá toppi. Kúvettan með penslinum í var sett á hristara í 10 sek. Þá var penslinum þrýst innan á hliðar kúvettunnar til að pressa burt vökva og síðan tekinn úr kúvettunni. Þá var 100µl af LUMIT-QM (ensíminu) bætt í kúvettuna og sýnið mælt.

Með þessari mælingu var ATP losað úr frumunum. Mældar eru hlutfallslegar ljóseiningar (Relative Light Units (RLU)) sem samsvarar magni ATP í sýninu (Stanley 1989).

Ljósmælingin byggir á eftirfarandi hvarfi:

LUCIFERIN + LUCIFERASE + ATP

LUCIFERIN-LUCIFERASE-ADP) + O₂

OXYLUCIFERIN +LUCIFERASE-AMP + H₂O

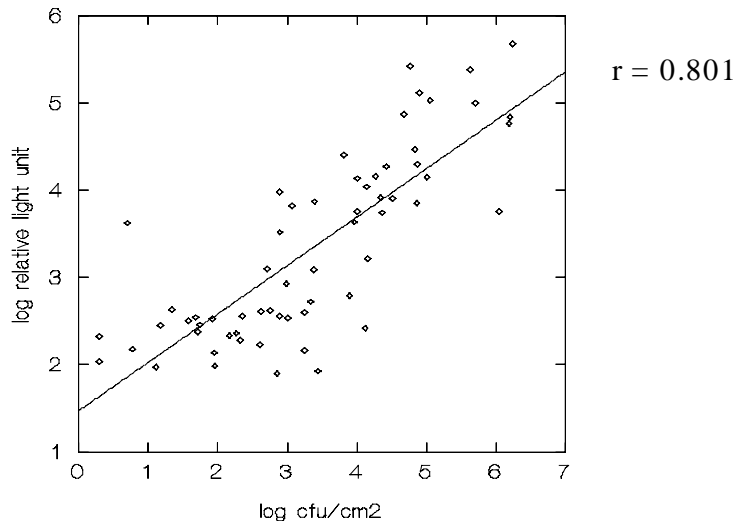
OXYLUCIFERIN + LUCIFERASE + AMP + FÓTÓNA

Luciferasi er ensím unnið úr eldflugu og hvetur það ATP hvarfið og myndar ljós sem hægt er að mæla. Til þess að efnahvarfið verði þarf co-factorinn D-luciferin að vera til staðar sem er þá bætt í prófefnin sem notuð eru.

Tölfræðileg úrvinnsla var gerð með SYSTAT for *Windows: Statistics, Version 5* Edition. Evanston, IL: SYSTAT, Inc. 1992. .

3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR

Mynd 1 sýnir sambandið milli hefðbundinnar örverutalningar á Plate count agar við 22°C og mælingar á ATP með LUMAC Biocounter M 1500 Light ljósmæli.



Mynd 1. Sambandið á milli ATP-mælingu (RLU-ljóseiningar) og hefðbundinnar örverutalningar (\log_{10} fjöldi örvera/cm²)

Fylgnistuðullinn (r) var 0,801 og því er ályktað að ATP - mæling sé góður kostur til að meta árangur þrifa í fiskvinnsluhúsum, sérstaklega þegar hraðinn er tekinn með í myndina. Þegar sýni stóðust ekki viðmiðun samkvæmt ATP-aðferðinni en stóðust viðmiðun hefðbundinnar talningar er hægt að skýra mismuninn með því að mælst hafi ATP úr fiskleifum sem örveruaðferðin mælir ekki. Ef engar örverur eru farnar að vaxa í fiskleifum þá mælist ekkert með örverufræðilegum aðferðum en ætla má að eftir skamman tíma færu þær að vaxa í þeim óhreinindum sem eru til staðar í lok þrifa. Í sumum sýnunum var þessu öfugt farið, þar sem mæling með ATP stóðst viðmiðun en ekki hefðbundin örverumæling. Þetta gæti verið vegna þess að örverufrumur séu laskaðar eftir áhrif hreinsiefna þannig að ATP-forði sé lítill (Griffiths 1996).

Þar sem ATP-mælir mælir öll óhreinindi (örverufrumur og vöðvafrumur), ekki bara þau sem eru af örverufræðilegum toga, er hún mun öflugri sem matsaðferð fyrir þrif miðað við þær aðferðir sem nú eru notaðar og byggjast aðeins á örverufræðilegu mati. Nokkur atriði þarf að hafa í huga þegar verið er að nota ATP-mælingu. Jónabindar

eins og EDTA og fosföt, yfirborðsvirk efni, salt og málmjónir sem oft eru hluti af samsetningu hreinsiefna, geta haft áhrif á mælingu, þannig að gildið sem fæst er of lágt eða of hátt (Griffiths 1995). Niðurstöður rannsókna (Velazquez 1997) hafa þó bent til þess að þegar verið er að nota fjörgild ammóníumsambönd eða hypoklóríð sem sótthreinsiefni þá hafi þessi áhrif ekki endanleg áhrif á niðurstöðurnar við matið á þrifunum.

Kostur ATP - mælingar er augljós sem hluti af HACCP kerfi matvælaframleiðenda og getur virkað sem hvatning fyrir starfsfólk sem vinnur við þrif ef það fær að sjá hvernig tekst til með þrifin og jafnvel að mæla sjálf. Ómetanleg er sú staðreynd að hægt er að endurtaka þrif strax eftir mælingu, þannig að þrifin ættu að vera í góðu lagi þegar vinnslan hefst. Annar augljós kostur er að kostnaður vegna ATP-mælinga er aðeins fjórðungur af kostnaði við hefðbundna penslun (miðað við gjaldskrá Rf í október 97).

HEIMILDIR

M. W. Griffiths (1995). Bioluminescence and Food Industry. *J. of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 4, 65-75.

M.W. Griffiths(1996). The Role of ATP Bioluminescence in the Food Industry: New Light on Old Problems. *Food Technology*-June 1996, 62-72.

K. Seeger and M.W. Griffiths(1994). Adenosine Triphosphate Bioluminescence for Hygiene Monitoring in Health Care Institutions. *J. Food Production*, Vol. 57, No. 6, 509-512.

P.E. Stanley(1989). A Concise Beginner's Guide to Rapid Microbiology Using Adenosine Triphosphate(ATP) and Luminescence.
SAB Technical Series no. 26: ATPLuminescence, Rapid Methods in Microbiology.

P.E. Stanley and B.J. McCarthy (1989). Reagents and Instruments for Assays using ATP and Luminescence: Present Needs and Future Possibilities in Rapid Microbiology.
SAB Technical Series no. 26: ATPLuminescence, Rapid Methods in Microbiology

M. Velazquez and J. M. Feirtag (1997). Quenching and Enhancement Effects of ATP Extractants, Cleaners and Sanitizers on the Detection of the ATP Bioluminescence Signal. *J. Food Production*, Vol. 60, No. 7, 799-803.

Viðauki 1. Niðurstöður mælinga

Samanburður á hefðbundinni örverutalningu og mælingu á ATP með "hygiene monitoring" QM kit frá LUMAC and LUMAC BIOCOUNTER M 1500 Light

Samples nr.	TPC/cm ²	logTPC/cm ²	ATP RLU	log ATP	black count	control(RLU)s	TPC 22°C criteria	ATP criteria
1	2.460	3,39	1.223	3,09	4	94	f	f
2	48.400	4,68	73.775	4,87			f	f
3	1.790	3,25	399	2,60			f	f
4	9.460	3,98	4.290	3,63			f	f
5	800	2,90	3.289	3,52			f	f
6	70.000	4,85	29.463	4,47			f	f
7	56	1,75	286	2,46			f	f
8	22	1,34	425	2,63			f	f
9	580	2,76	418	2,62			f	f
10	52	1,72	235	2,37			f	g
11	10.450	4,02	5.751	3,76			f	f
12	6	0,78	151	2,18			g	g
13	13.500	4,13	260	2,41			f	f
14	1.180	3,07	6.551	3,82			f	f
15	33.000	4,52	8.006	3,90			f	f
16	2.180	3,34	526	2,72			f	f
17	514.000	5,71	100.000	5,00	3	37	f	f
18	1.150.000	6,06	5.693	3,76			f	f
19	790	2,90	357	2,55			f	f
20	780	2,89	9.516	3,98			f	f
21	188	2,27	229	2,36			f	g
22	420	2,62	407	2,61			f	f
23	14.000	4,15	10.911	4,04			f	f
24	105.000	5,02	13.991	4,15			f	f
25	230	2,36	360	2,56			f	f
26	2	0,30	212	2,33			g	g
27	90	1,95	137	2,14			f	g
28	148	2,17	215	2,33			f	g
29	212	2,33	192	2,28			f	g
30	0	0,00	73	1,86			g	g
31	720	2,86	79	1,90			f	g
32	2.800	3,45	5.487	3,74			f	f
33	84	1,92	334	2,52			f	f
34	2.490	3,40	7.373	3,87			f	f
35	1.815.000	6,26	470.466	5,67	4	68	f	f
36	1.650.000	6,22	68.676	4,84			f	f
37	38	1,58	319	2,50			f	f
38	75.300	4,88	19.860	4,30			f	f
39	445.000	5,65	240.582	5,38			f	f
40	59400	4,77	261732	5,42			f	f
41	27.400	4,44	18639	4,27			f	f
42	98	1,99	851	2,93			f	f
43	520	2,72	1.251	3,10			f	f
44	74.800	4,87	7.086	3,85			f	f
45	1.595.000	6,20	57.407	4,76			f	f
46	19.000	4,28	14.458	4,16			f	f
47	14600	4,16	1.627	3,21			f	f
48	117.000	5,07	106847	5,03			f	f
49	23900	4,38	5.513	3,74			f	f
50	1030	3,01	340	2,53			f	f
51	82.000	4,91	129.572	5,11			f	f
52	10.500	4,02	13.575	4,13			f	f
53	NA		163	2,21				g
54	2	0,30	109	2,04			g	g
55	49	1,69	347	2,54			f	f
56	410	2,61	170	2,23			f	g
57	22.500	4,35	8.245	3,92			f	f
58	15	1,18	283	2,45			f	f
59	6.600	3,82	25.163	4,40			f	f
60	92	1,96	97	1,99			f	g
61	5	0,70	4.193	3,62			g	g
62	7.980	3,90	612	2,79			f	f
63	1.770	3,25	146	2,16			f	g
64	13	1,11	93	1,97			f	g

Viðmiðunargildi fyrir talningu á skálum var: Gott = <5 kól/cm².

Viðmiðunargildi fyrir ATP-mælingu var: Gott = <250RLU, sem er ca. 3x stærra gildi en staðall.

Viðauki 2. Útreikningar á fylgni

**DEP VAR: LOG22 N: 62 MULTIPLE R: 0.801 SQUARED MULTIPLE R: 0.641
ADJUSTED SQUARED MULTIPLE R: .635 STANDARD ERROR OF ESTIMATE:
0.918**

VARIABLE	COEFFICIENT	STD ERROR	STD COEF	TOLERANCE	T	P(2 TAIL)
CONSTANT	-0.496	0.389	0.000	.	-1.274	0.207
LOGATP	1.154	0.111	0.801	1.000	10.355	0.000

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
REGRESSION	90.294	1	90.294	107.233	0.000
RESIDUAL	50.522	60	0.842		