

Perspektívy merania mikrobiologickej kvality surového mlieka laserovou prietokovou cytometriou

MARTIN TOMÁŠKA

SÚHRN. Laserová prietoková cytometria sa využíva na meranie mikrobiologickej kvality surového mlieka ako rutinná metóda. Jej princípom je selektívne zafarbenie mikroorganizmov a následné počítanie impulzov, ktoré vzniknú po ožiarení buniek, usporiadaných v monobunkovej línii v detektore, laserovým svetlom. V porovnaní s určenou platňovou metódou má laserová prietoková cytometria viaceré výhody, akými sú rýchlosť a lepšia zhodnosť merania. Na to, aby výsledky namerané touto metódou primárne v IBC (individuálne bakteriálne bunky) mohli byť vyjadrené v jednotkách určenej metódy - KTJ (jednotky tvoriace kolónie), je potrebné vytvoriť prepočítavací vzťah. Ten musí reprezentovať oblasť, pre ktorú sa bude používať a je potrebné ho neustále verifikovať. Predsa však, keďže je princíp merania laserovou prietokovou cytometriou odlišný ako pri určenej metóde, vyjadrená mikrobiologická kvalita sa môže odlišovať. Pokiaľ je prepočítavací vzťah vyjadrený lineárnou regresiou, interval spoľahlivosti merania závisí predovšetkým od smerodajnej odchýlky regresie ($s_{y,x}$).

Kľúčové slová: laserová prietoková cytometria; mikrobiologická kvalita; surové mlieko

Systém kontroly kvality surového mlieka je celosvetovo dobre prepracovaný, čo sa týka legislatívy, inštitúcií, systému, vzorkovania, metód a využívania výsledkov. Tie slúžia na posúdenie zdravotnej bezchybnosti surového mlieka a ovplyvňujú jeho nákupnú cenu. Mikrobiologická kvalita je jednou z hlavných vlastností mlieka, ktorá sa pravidelne preveruje. Podľa príslušnej európskej legislatívy (smernica CD 92/46 [1]) limitná hodnota celkového počtu mikroorganizmov stanoveného kultivačnou metódou pri 30 °C [2], je 100 000 KTJ.ml⁻¹, pričom sa jedná o geometrický priemer z 2 mesiacov pri skúšaní aspoň 2 vzoriek za mesiac. V praxi to znamená, že pokiaľ mlieko v danom období presahuje tento limit, nesmie sa ďalej použiť na ľudskú výživu až do doby vykonania účinných nápravných opatrení.

Interpretácia výsledkov merania mikrobiologickej kvality

Výsledky nešpecifických mikrobiologických metód, ako je napríklad meranie mikrobiologickej kvality, je komplikované interpretovať. Podľa zvoleného spôsobu skúšania sa také parametre, ako napr. zastúpenie jednotlivých druhov, biologická aktivita, výskyt zhlukov buniek, subletálne poškodenia redukujú do odhadu jedného parametra, napr. schopnosti vytvárať kolónie za podmienok vykonania metódy. Z tohto je zrejmé, že bez ohľadu na zvolenú metódu, žiaden výsledok nereprezentuje celkový absolútny obraz o mikrobiologickej kvalite. Výsledky sa preto musia interpretovať zásadne za podmienok príslušnej metódy, ktorá sa musí dodržiavať [3].

Pre mnohé mikrobiologické metódy nemožno kalibráciu chápať v striktnom ponímaní jej pôvodnej definície, nakoľko meraná vlastnosť sa nenachádza v štandardizovanej forme. Signál nameraný metódou je považovaný iba za odhad skutočnej hodnoty [4].

Pri porovnávaní výsledkov nameraných odlišným spôsobom prichádza do úvahy ich prepočet na jednotky určenej metódy. Definovanie univerzálneho spôsobu vytvorenia prepočítavacieho vzťahu je stále predmetom diskusií. Súčasné názory sú formulované v návrhu normy ISO/FDIS 21187 [5] (v systéme noriem IDF je to identický návrh IDF 196), kde sú sumarizované určité pravidlá:

- vytvorenie prepočtu a jeho verifikácia vrátane všetkých súvisiacich činností, ako je napr. vzorkovanie, vykonávanie určenej metódy, dokumentácia a záznamy, sa riadi ustanoveniami platnými pre akreditáciu skúšobných laboratórií [6],
- rutinná metóda je validovaná vhodným spôsobom, napríklad podľa odporúčaní [7],
- prepočet je vytvorený takým spôsobom, aby reprezentoval oblasť jeho budúceho použitia,
- spoľahlivosť prepočtu je trvale verifikovaná.

Určená metóda

Na meranie mikrobiologickej kvality mlieka je určená metóda (tento pojem sa uprednostňuje pred pojmom referenčná) popísaná v Council Decision 91/180/EEC [2], alebo ISO 4833 [8], resp. IDF 100B [9]. Je podrobne definovaná, má nekomerčný charakter a je vykonateľná v bežných laboratórnych podmienkach. Jej detekčná schopnosť pokrýva pomerne široké

spektrum mikroorganizmov s dostatočnou citlivosťou. Hlavné nevýhody tejto metódy možno zhrnúť nasledovne [3]:

- dajú sa ňou dokázať iba tie mikroorganizmy, ktoré sú schopné tvoriť kolónie za podmienok metódy (dostupnosť živín a kyslíka, vhodná teplota a doba inkubácie),
- počítateľné kolónie môžu pochádzať od jednotlivých buniek, ale aj bunkových agregátov,
- výsledky merania sú dostupné za dlhý čas - 72 hodín,
- vyžaduje laboratórny personál s praktickými skúsenosťami,
- opakovateľnosť a reprodukovateľnosť je v porovnaní s inými rutinnými metódami horšia.

Rutinné metódy

Rutinné metódy sú založené na rôznych princípoch. V prvom rade sa rôznymi spôsobmi modifikuje, zjednodušuje určená metóda: v spôsobe očkovania (mikroklučky), v príprave médií (Petrifilm) alebo v počítaní (automatizované počítanie kolónií). Samozrejme existujú metódy úplne odlišné, pri ktorých sa napríklad počítajú rôznym spôsobom upravené mikroorganizmy (automatizovaná fluorescenčná mikroskopia, priama epifluorescenčná technika na filtroch, prietoková cytometria), alebo sa merajú iné vlastnosti, ktoré priamo súvisia s mikrobiologickou kvalitou (meranie vodivosti, zákalu, respirácie, množstva metabolických produktov, ATP, lipopolysacharidov). Nemožno zabudnúť ani na kedysi veľmi rozšírený reduktázový test a nastupujúce techniky PCR [3]. Takmer všetky rutinné metódy sú komerčného charakteru a teda nie sú detailne popísané v systéme noriem. Existujú iba určité všeobecné návody ich posúdenia a validácie [4, 7].

Vývoj v prietokovej cytometrii

Prvé praktické skúsenosti s použitím prietokovej cytometrie možno datovať od prvej polovice 30-tych rokov minulého storočia. V polovici 50-tych rokov bol vyvinutý prietokový cytometer, ktorý meral zmeny elektrickej vodivosti medzi bunkami a médiom, v ktorom sa nachádzali. Tento princíp sa využíval v mnohých mliečnych analyzátoroch na počítanie somatických buniek. Na začiatku 70-tych rokov sa účinnosť merania zvýšila použitím laserového svetla na ilumináciu [10].

Prienik prietokovej cytometrie do mikrobiológie bol limitovaný malými rozmermi mikroorganizmov a nízkou koncentráciou látok - DNA alebo RNA, ktoré by mohli byť detegovateľné. Až zlepšenie optických technológií a vývoj v spôsobe flourescenčného farbenia - napr. zavedením etídiumbromidu umožnilo koncom 70-tych rokov lepšie využitie tejto techniky pri meraní mikrobiologickej kvality. Predsa však bolo potrebné prekonať nasledujúce problémy:

1. Selektívne farbenie buniek. Použitie farbív, ktoré sa špecificky viažu na určité zložky buniek je komplikovanejšie, ako pri somatických bunkách. Mikroorganizmy majú zložitejšiu stavbu membrány a mnohé vykazujú efektívne vylučovanie prostredníctvom pumpy. Navyše Gram-negatívne baktérie sú menej permeabilné, ako Gram-pozitívne a preto je potrebné ich vonkajšiu bunkovú stenu pred farbením vhodne permeabilizovať. Pri bežnom spôsobe farbenia dochádza k označeniu všetkých mikroorganizmov a navyše sa nerozlišujú živé a mŕtve bunky. Na zvýšenie selektivity možno použiť špecifické protilátky a farbivá vhodné na rozlíšenie viability.
2. Veľkosť a usporiadanie buniek pri meraní. Meniaca sa veľkosť mikroorganizmov a množstvo prítomnej DNA spolu s potrebou dosiahnuť monobunkovú vrstvu pri meraní je problém pri potravinových maticiach. Z uvedeného dôvodu mnohé prietokové cytometre, ktoré sa skúšali na modelových vzorkách a dokonca aj na klinickom materiáli, nebolo možné priamo použiť pri analýze mlieka.

Napriek úspešnosti mnohých modifikácií, zatiaľ sa nepodarilo vyvinúť metódu na princípe prietokovej cytometrie, ktorá by bola v absolútnej zhode s určenou metódou, čo je však vzhľadom na ich metodologickú odlišnosť asi nemožné [10].

Metóda BactoScan™ FC

BactoScan™ FC (BSC FC) je zariadenie od výrobcu FOSS Electric (Hillerød, Dánsko) určené na meranie mikrobiologickej kvality surového mlieka metódou laserovej prietokovej cytometrie. Na trhu sa objavilo v druhej polovici 90-tych rokov minulého storočia, ako typ nasledujúci po modelovom rade 8000 (BSC 8000), ktorý bol založený na inom princípe počítania buniek (priama mikroskopia na rotujúcom disku).

BSC FC meria mikrobiologickú kvalitu primárne v individuálnych bakteriálnych bunkách (IBC), pričom ide, ako pri všetkých mikrobiologických

metódach, o odhad skutočnej hodnoty počtu mikroorganizmov. Keďže metóda má komerčný charakter, nie sú známe všetky podrobnosti postupu. Predsa ho možno zjednodušene popísať nasledovne [11]:

Vzorka surového mlieka (približne 4,5 ml) po dôkladnom zamiešaní prechádza pipetou do zariadenia cez 100 μ m filter, čím sa dokonale homogenizuje. Prvé podiely vzorky sa použijú na prepláchnutie systému. Časť vzorky sa dávkovacím zariadením preniesie do inkubačnej jamky, kde sa zmieša s činidlom, pozostávajúcim z enzýmu, tlmivého roztoku, farbiva (etídiumbromid) a detergentu. Zmes sa inkubuje a 2-krát homogenizuje - pri teplote 50 °C po dobu 8 minút, čím sa eliminuje vplyv prítomných somatických buniek, proteínov a tukov v mlieku. Po ukončení inkubácie sa časť vzorky nastrekne do meracej bunky - tu je unášaná pomocou špeciálnej kvapaliny (pozostávajúcej z tlmivého roztoku a detergentu) konštantnou rýchlosťou, pričom prítomné mikroorganizmy sú usporiadané v monobunkovej vrstve. Keď vzorka dosiahne merací bod vo fluorescenčnom detektore, laserové svetlo ožiari zafarbené bunky, ktoré emitujú svetelné impulzy, podľa obsahu DNA. Nastavením diskriminačnej hladiny sú z počítania vylúčené tie impulzy, ktoré sú príliš malé pre typické baktérie. Výsledky sú prezentované ako IBC. μ l⁻¹. Po každom meraní sa systém vyčistí a vyprázdni, aby sa minimalizovala chyba z prenosu a upchávanie. Celé meranie je automatizované, riadené cez osobný počítač a veľmi rýchle - trvá iba niekoľko minút.

Merací rozsah je od 5 IBC. μ l⁻¹ do minimálne 20 000 IBC. μ l⁻¹ [11], podľa SUHREN a WALTA [10] až do 70 000 IBC. μ l⁻¹. Chyba z prenosu je nízka, výrobca udáva menej ako 0,5 % [11], čo sa aj prakticky potvrdzuje dosahovaním ešte nižších hodnôt [10, 12, 13]. Predsa však vzorky s veľmi vysokým počtom IBC môžu významnejšie ovplyvniť nasledujúcu vzorku, resp. 30-tu v poradí - čo je dané konštrukciou zariadenia (inkubačné jamky sú zoradené na obvode otáčacieho kruhu, v počte 30 a môžu sa takouto vzorkou kontaminovať) [10].

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť merania závisí od meraných počtov, pričom SUHREN a WALTE [14] v jednej z posledných štúdií, pri meraní 10 vzoriek mlieka na 22 zariadeniach BSC FC v 19 laboratóriách, zistili aktuálne hodnoty, ktoré sú uvedené v tab. 1. Vo všeobecnosti je opakovateľnosť a reprodukovateľnosť merania na BSC FC oveľa lepšia, ako pri určenej metóde [8] (0,25 log KTJ.ml⁻¹, resp. 0,45 log KTJ.ml⁻¹) a aj ako pri meraní na predchádzajúcom modeli BSC 8000 - s výnimkou veľmi nízkych počtov - menších alebo rovných 20 IBC. μ l⁻¹.

Hoci je mlieko mikrobiologicky heterogénna matrica, je zaujímavé poznať citlivosť merania vybraných mikroorganizmov. SUHREN a WALTE [10] v orientačnom pokuse kontaminovali mlieko s prirodzeným nízkym počtom

TAB. 1. Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť merania na BactoScan™ FC [14].
 TAB. 1. Repeatability and reproducibility of measurements with BactoScan™ FC [14].

Merací rozsah ¹ (log IBC.μl ⁻¹)	Opakovateľnosť ² - r (log IBC.μl ⁻¹)	Reprodukovateľnosť ³ - R (log IBC.μl ⁻¹)
1,6	0,126	0,186
2,0	0,086	0,126
2,4	0,066	0,115

IBC - individuálne bakteriálne bunky.

IBC - individual bacterial cells. 1 - measurement level, 2 - repeatability, 3 - reproducibility.

mikroorganizmov mastitídnyimi patogénmi a to následne merali na zariadeniach BSC FC a BSC 8000. Dominantná mikroflóra spôsobila v určitých prípadoch odlišné výsledky.

Vplyv možných interferujúcich faktorov na meranie sa sledoval najmä z pohľadu prítomných somatických buniek [10, 15]. Farbivo - etídiumbromid, ktoré sa pri tejto metóde používa, sa selektívne viaže na nukleové kyseliny. Ich priemerné množstvo v baktériách je asi tisícnásobne nižšie, ako v somatických bunkách, preto aj podmienky merania sú prispôbené tejto skutočnosti. Napriek tomu, pri vzorkách s veľmi vysokým počtom somatických buniek (viac ako 1 000 000 ml⁻¹ resp. viac ako 2 000 000 ml⁻¹) bolo meranie negatívne ovplyvnené - to znamená s rastúcim počtom somatických buniek sa zvyšoval aj počet falošne meraných IBC.

Samozrejme, vzhľadom na vlastnosti farbiva, je zaujímavá aj vizualizácia neviabilných buniek, ktoré za podmienok určenej metódy nie sú merateľné - napríklad po zázehre na 80 °C s výdržou niekoľko minút. Potvrdilo sa, že počty IBC meraných pred zázehrom a po zázehre sa takmer nezmenili, čo znamená - touto rutinnou metódou sú merateľné aj neviabilné bunky. Logicky, ani krátkodobé predhriatie vzoriek na 40 °C nemalo na meranie výrazný vplyv, takže samotné vzorky nie je potrebné pred meraním zahrievať [10].

Prepočet výsledkov

Ak chceme získavať výsledky merania mikrobiologickej kvality v jednotkách určenej metódy - KTJ.ml⁻¹, musíme vytvoriť prepočítavací vzťah. Postup jeho vytvorenia a verifikácie je rámcovo daný návrhom normy ISO/FDIS 21187 [5].

Prvý dôležitý krok v stratégii vytvorenia prepočtu je vytvorenie reprezentatívneho súboru vzoriek, s typickým zložením mlieka pre oblasť platnosti

vzťahu. Mikroflóra mlieka, ale aj obsah potenciálne interferujúcich faktorov závisí od množstva činiteľov, napr. od pôvodu vzoriek (plemeno, lokalizácia stáda z pohľadu spôsobu ustajnenia a geografickej polohy, sezónnosť, spôsob výživy, dojivosť), od spôsobu narábania so vzorkami (denný alebo obdenný zvoz mlieka, ručný alebo automatizovaný odber vzoriek, spôsob konzervácie vzoriek, teplota pri doprave vzoriek do laboratória, čas vykonania skúšok od odberu vzorky) a pod.

TAB. 2. Prepočítavacie vzťahy na BactoScan™ FC - surové kravské mlieko
 $y = \log \text{KTJ.ml}^{-1}$ [13, 17, 18].

TAB. 2. Regression for BactoScan™ FC - raw cow milk
 $y = \log \text{CFU.ml}^{-1}$ [13, 17, 18].

Projekt ¹	x = log	Zariadenie ²	n	y = ax + b	s _{y,x} = log KTJ.ml ⁻¹
Dánsko	IBC.μl ⁻¹	prototyp	273	y = 1,06x + 2,25	0,23
BAfM 1998	IBC.μl ⁻¹	prototyp	910	y = 1,05x + 2,42	0,23
Neuseeland 1998	IBC.μl ⁻¹	neuvedené	174	y = 1,00x + 2,23	0,29
Francúzsko 1998	IBC.ml ⁻¹	neuvedené	385	y = 0,76x + 0,66	0,30
Belgicko 1999	IBC.ml ⁻¹	neuvedené	508	y = 0,84x + 0,09	0,29
BAfM 1999	IBC.μl ⁻¹	sériový typ	1089	y = 0,92x + 2,77	0,30
Taliansko 2000	IBC.ml ⁻¹	neuvedené	384	y = 1,03x - 0,98	0,38
Slovensko 2002	IBC.μl ⁻¹	sériový typ	827	y = 0,94x + 2,82	0,26

IBC - individuálne bakteriálne bunky, n - počet vzoriek, s_{y,x} - smerodajná odchýlka regresie.
 IBC - individual bacterial cells, n - number of samples, s_{y,x} - standard deviation of the regression (s_{y,x} = log CFU.ml⁻¹). 1 - project, 2 - equipment.

TAB. 3. Prepočítavacie vzťahy na BactoScan™ FC - surové kravské, kozie a ovčie mlieko
 $y = \log \text{KTJ.ml}^{-1}$ [17].

TAB. 3. Regression for BactoScan™ FC - raw cow, goat and sheep milk
 $y = \log \text{CFU.ml}^{-1}$ [17].

Mlieko ¹	n	y = ax+b	s _{y,x} = log KTJ.ml ⁻¹
kozie ²	531	y = 0,804x + 0,234	0,38
kravské ³	83	y = 0,805x + 0,323	0,28
ovčie ⁴	535	y = 1,311x - 2,825	0,35
kravské	87	y = 0,772x + 0,347	0,32

n - počet vzoriek, s_{y,x} - smerodajná odchýlka regresie.
 n - number of samples, s_{y,x} - standard deviation of the regression (s_{y,x} = log CFU.ml⁻¹).
 1 - milk, 2 - goat, 3 - cow, 4 - sheep.

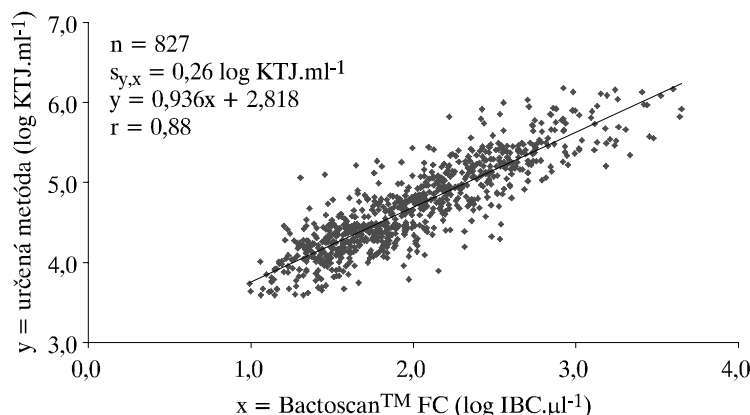
Po vytvorení reprezentatívneho súboru vzoriek sa tento paralelne meria najprv rutinnou metódou - na BSC a potom, čo možno za najkratší čas, určenou metódou. Po prevedení výsledkov do stupnice dekadických logaritmov sa ako nezávislá premenná x použijú výsledky z rutinnej metódy a ako závislá premenná y výsledky z určenej metódy [11]. Dôvody na tento opačný postup súvisia s očakávaným pomerne nízkym korelačným koeficientom u metód, z ktorých každá je založená na inom princípe, čo znamená, že regresná krivka významne závisí od toho, ktorý parameter bol zvolený ako závislá, resp. nezávislá premenná. Rovnako je tomu aj z praktických dôvodov, pretože výsledky určenej metódy, s ktorými sa ďalej pracuje (závislá premenná) sú prepočítané z výsledkov rutinnej metódy - z nezávislej premennej [16]. Po vyznačení dát na príslušné osi sa vizuálne hodnotí rozloženie bodov. Vo viacerých štúdiách [10, 13, 15-18] bola prezentovaná približne lineárna závislosť medzi výsledkami z oboch metód, v celom meracom rozsahu a preto sa pri tejto metóde používa na prepočet jedna rovnica lineárnej regresie. Jej príklady sú uvedené v tab. 2 [13, 17, 18] pre surové kravské mlieko a pre porovnanie v tab. 3 [17] aj pre surové ovčie a kozie mlieko. Tabuľky obsahujú informácie aj o hodnotách smerodajnej odchýlky regresie $s_{y,x}$, ktorá pri nepriamych analytických metódach podáva spoľahlivejší obraz o presnosti, ako samotný korelačný koeficient r [19]. Výrobca zariadenia odporúča ako limitnú smerodajnú odchýlku regresie $s_{y,x} = 0,35 \log \text{KTJ.ml}^{-1}$ [11].

Z tab. 1 a z tab. 2 možno odvodiť nasledovné závery:

1. Prepočítavacie vzťahy získané v rôznych projektoch sa vzájomne líšia i pri tom istom druhu mlieka, i keď nie dramaticky, vzhľadom na interval spoľahlivosti.
2. Väčší rozdiel možno pozorovať pri porovnaní ovčieho a kravského mlieka. Tu sú rozdiely výraznejšie najmä v dolnom intervale merania, naopak pri kozom a kravskom mlieku sa prepočty takmer podobajú [17]. Predsa však vplyv zloženia ovčieho a kozieho mlieka na spoľahlivosť merania nie je tak detailne preskúmaný, ako pri mlieku kravskom.

Grafické zobrazenie vzťahu medzi výsledkami z BactoscanTM FC a z určenej metódy [8], ktoré boli zistené na Slovensku v roku 2002 [18] na surovom kravskom mlieku, je uvedené na obr. 1.

SUHREN a kol. [16] sa pomocou štatistických metód pokúšali determinovať vplyv faktorov ovplyvňujúcich prepočet. Hoci niektoré vplyvy bolo možné popísať, z pohľadu trvalej verifikácie vzťahu sa ukázalo veľmi komplikované výpočty aktualizovať.



Obr. 1. Vzťah medzi výsledkami z Bactoscan™ FC a určenej metódy
- surové kravské mlieko, Slovensko 2002 [18].

n - počet vzoriek, $s_{y,x}$ - smerodajná odchýlka regresie, r - korelačný koeficient.

Fig. 1. Relation between Bactoscan™ FC results and the standard method results
- raw cow milk, Slovakia 2002 [18].

y = the standard method (log CFU.ml⁻¹), n - number of samples, $s_{y,x}$ - standard deviation of the regression ($s_{y,x} = 0,26 \log \text{CFU.ml}^{-1}$), r - correlation coefficient.

Praktické dopady zavedenia metódy BactoScan™ FC

Hoci metóda BSC FC nie je jediná dostupná na meranie mikrobiologickej kvality surového mlieka, je v Európe najviac rozšírená v systéme laboratórií, vykonávajúcich skúšanie za účelom preplácania. Praktické využívanie výsledkov merania na týchto zariadeniach pri posudzovaní kvality suroviny má svoje špecifiká, čím sa charakteristiky metódy dostávajú do iného uhlu pohľadu. Prepočet primárnych výsledkov merania na jednotky určenej metódy je asi najdiskutabilnejší prvok:

1. Firma FOSS Electric presadzuje cestu oficiálneho vyjadrovania výsledkov priamo v IBC [11]. Hoci je to najspoľahlivejší spôsob, z pohľadu porovnávania výsledkov je otázny - udávanie limitných hodnôt v IBC by zrejme znevýhodnilo všetky ostatné dostupné alternatívne metódy.
2. Hoci krajiny majú v národnej legislatíve, resp. v systéme noriem vo všeobecnosti popísaný spôsob vytvorenia prepočtu a jeho verifikácie [20, 21], samotná realizácia požiadaviek býva variabilná. Súvisí to napríklad s tým, že v niektorých laboratóriách využívajú paralelne starší typ zariadení - BSC 8000, na ktorý je dostupný odlišný prepočítavací vzťah. V takejto

situácii FOSS Electric odporúča jeden z alternatívnych postupov [22], pri ktorom sú napríklad výsledky z BSC FC prepočítané, akoby boli namerané na BSC 8000 a až potom na jednotky určenej metódy.

3. To, že prepočet výsledkov je determinovaný podmienkami, pri ktorých bol vytvorený a na ktoré má platiť [5], môže byť z obchodného hľadiska problematické. Na laboratórium môže byť napríklad vznesená požiadavka skúšať vzorky od prvovýrobcu, ktorý sa nepodieľal na vytvorení aktuálneho prepočítavacieho vzťahu. Mikrobiologická kvalita takýchto vzoriek môže byť odlišná od nameranej, s možným dopadom na predajnú cenu. Aktualizácia prepočítavacieho vzťahu vyplývajúca z procesu verifikácie sa totiž vykonáva vždy s oneskorením.
4. Pri porovnávaní výsledkov vzoriek paralelne meraných určenou metódou a BSC FC musíme brať do úvahy neistotu merania. Presnosť BSC FC, vyjadrená podľa [19] ako $\pm 1,96s_{y,x}$, môže mať teoreticky hodnotu až $\pm 0,69 \log \text{KTJ.ml}^{-1}$, ak pripúšťame maximálnu smerodajnú odchýlku regresie $s_{y,x} = 0,35 \log \text{KTJ.ml}^{-1}$ [11]. To na úrovni $100\,000 \text{KTJ.ml}^{-1}$ znamená rozpätie výsledkov od $20\,000 \text{KTJ.ml}^{-1}$ do $490\,000 \text{KTJ.ml}^{-1}$. Hoci vo väčšine prípadov je hodnota $s_{y,x}$ nižšia (pozri tab. 2), aj tak sa interval zužuje iba nepatrne, napr. v prípade belgickej štúdie je to od $27\,000 \text{KTJ.ml}^{-1}$ do $366\,000 \text{KTJ.ml}^{-1}$ [13]. Keďže táto úroveň merania predstavuje práve limit štandardnosti surového kravského mlieka, môže byť akceptovateľnosť výsledkov metódy BSC FC, hoci nameraných spoľahlivým spôsobom, na prvý pohľad problematická. Treba si však uvedomiť, že limity v legislatíve sú definované ako geometrický priemer viacerých individuálnych výsledkov a je tomu aj preto, aby sa eliminovala prirodzená neistota merania mikrobiologickej kvality. Ak sa výsledky z oboch metód odlišujú viac, s 95% pravdepodobnosťou to znamená, že prepočet nie je spoľahlivý alebo, že sa týka mlieka s netypickým zložením. Hoci posledne menovaný prípad nie je bežný, môže nastať. Bezrúč do úvahy zoznam činiteľov, ktoré determinujú prepočítavací vzťah, môžu sa vyskytovať vzorky, ktoré majú napríklad vyšší podiel mŕtvych mikroorganizmov, prípadne vysoký počet somatických buniek. Alebo sa v mlieku môžu nachádzať látky nebiologického charakteru a sú napriek tomu zariadením merané ako mikroorganizmy - v takýchto situáciách môžu byť rozdiely medzi určenou metódou a metódou BSC FC ojedinele ešte väčšie.

Okrem vyššie diskutovaných otázok, má meranie mikrobiologickej kvality metódou laserovej prietokovej cytometrie aj svoje nesporné výhody:

1. Pri porovnaní výsledkov na dvoch zariadeniach, pri používaní toho istého prepočítavacieho vzťahu sa skutočne dosahujú zhodnejšie výsledky, ako

pri meraní tej istej vzorky v dvoch laboratóriách určenou metódou. Potvrdzujú sa tak lepšie parametre reprodukovateľnosti metódy.

2. Dostupnosť viacerých nástrojov na kontrolu spoľahlivosti merania, je ďalšou prednosťou tejto rutínnej metódy (celoeurópske medzilaboratórne porovnania, kontrolné vzorky, pilotné vzorky a pod.).
3. Najväčšia praktická výhoda je rýchlosť získania výsledku do niekoľkých minút. Kombinácia rýchlosti informácie spolu so systémom, že nie individuálne výsledky, ale ich geometrický priemer je limitný, umožňuje prvovýrobcom okamžite vykonávať nápravné opatrenia, zväčša bez rizika okamžitého pozastavenia dodávky mlieka spracovateľovi.

Záver

Metóda BSC FC predstavuje príklad úspešnosti presadenia laserovej prietokovej cytometrie v potravinárskej mikrobiológii.

Okrem BSC FC, je komerčne dostupné aj podobné zariadenie Bacto-Count IBC, výrobcu Bentley Instruments (Chaska, Minnesota, USA), ktoré sa však v Európe zatiaľ používa v menšom rozsahu. Pri meraní na tomto zariadení je napríklad možné predpovedať dominantnú mikroflóru skúšaného mlieka podľa získaného rozloženia impulzov [23].

Hoci je metóda laserovej prietokovej cytometrie prakticky dostupná už niekoľko rokov, stále je aj v centre vedeckého záujmu. Predmetom skúmania je posúdenie vplyvov zloženia mlieka na prepočet výsledkov, charakteristiky reprodukovateľnosti metódy a zdokonaľovanie nástrojov vnútorlaboratórnej kontroly spoľahlivosti merania.

Metóda je určená všeobecne pre surové mlieko, najviac sa však používa pri meraní kvality kravského mlieka, menej pri mlieku ovčom a kozom. Tie sa od kravského mlieka význame odlišujú, nielen zastúpením typickej mikroflóry, ale aj počtom somatických buniek a chemickým zložením. Rastúca atraktivnosť mliečnych výrobkov z nich potvrdzuje význam skúmania vhodnosti využívania laserovej prietokovej cytometrie aj v tejto oblasti.

Podakovanie

Autor by chcel týmto poďakovať Dr. Gertraud Suhren z Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel, Nemecko za poskytnutie literatúry a cenné rady pri práci s touto metódou.

Projekty, týkajúce sa aplikácie laserovej prietokovej cytometrie v oblasti skúšania mikrobiologickej kvality surového mlieka na Slovensku, boli finančne podporené Ministerstvom pôdohospodárstva SR.

Literatúra

1. Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk based products. Official Journal of the European Communities. 14.9.1992, L268, s. 1-32.
2. Commission Decision of 14 February 1991 laying down certain methods of analysis and testing of raw milk and heat-treated milk. (91/180/EEC) Official Journal of the European Communities. 13.4.1991, L93, s. 1-48.
3. SUHREN, G. - REICHMUTH, J.: Interpretation of quantitative microbiological results. *Milchwissenschaft*, 55, 2000, s. 18-22.
4. IDF-Standard 161A. Milk. Quantitative determination of bacteriological quality. Guidance on evaluation of routine methods. 1995.
5. ISO/FDIS 21187. Milk. Quantitative determination of bacteriological quality. Guidance for establishing a conversion relationship between routine method results and anchor method results and its verification. 2003.
6. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 1999.
7. ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods. 2003.
8. ISO 4833. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 °C. 2003.
9. IDF-Standard 100B. Milk and milk products. Enumeration of microorganisms (Colony count technique at 30 °C). 1991.
10. SUHREN, G. - WALTE, H.-G.: First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 50, 1998, s. 249-275.
11. FOSS ELECTRIC, Hillerød, Dánsko: Bactoscan FC TYPE 73700 Reference Manual. P/N 1025143, Issue 5 GB, January 2001. 172 s.
12. BOLZONI, G. - MARCOLINI, A. - VARISCO, G.: Evaluation of the BactoScan FC. 2. Stability, repeability, carry-over and linearity. *Milchwissenschaft*, 56, 2001, s. 318-s321.
13. NINANE, V. - DE REU, K. - ORGER, R. - REYBROECK, W. - GUYOT, A.: Evaluation du BactoScan FC pour la numération des bactéries du lait cru. *Lait*, 80, 2000, s. 527-538.
14. SUHREN, G. - WALTE, H.-G.: Determination of precision data of the BactoScan FC-method by an interlaboratory study. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 53, 2001, s. 269-282.
15. BOLZONI, G. - MARCOLINI, A. - VARISCO, G.: Evaluation of the BactoScan FC. 1. Accuracy, comparison with BactoScan 8000 and somatic cells effect. *Milchwissenschaft*, 55, 2000, s. 67-70.

16. SUHREN, G. - REICHMUTH, J. - WALTE, H. G.: Bacteriological quality of raw milk: Conversion of BactoScan-FC counts onto the scale of the official method. *Milchwissenschaft*, 56, 2001, 380-384.
17. SUHREN, G. - WALTE, H.-G. - REICHMUTH, J.: Zum Einsatz der automatisierten Durchflussszytometrie als Routinemethode für die Erfassung der bakteriologischen Qualität von Anlieferungsmilch. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 52, 2000 s. 97-143.
18. TOMÁŠKA, M.: Vytvorenie postupu na prepočet výsledkov z BactoScan FC 50 H na jednotky určenej metódy v podmienkach Slovenska. Závěrečná správa projektu. Žilina : Výskumný ústav mliekárenský, 2002. 34 s.
19. IDF-Standard 128A. Milk. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and daily control in the dairy laboratory. 1999.
20. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG: Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung der Keimzahl in Rohmilch - Durchflussszytometrische Zählung von Mikroorganismen (Routineverfahren), L01.01-7, Mai 2002.
21. STN 57 0539. Automatizované stanovenie mikroorganizmov v surovom mlieku s priamym počítaním bakteriálnych buniek. 2003.
22. FOSS ELECTRIC, Hillerød, Dánsko: BactoScan FC Conversion Manual. P/N 579201 Issue 2 GB, September 1998.
23. BENTLEY INSTRUMENTS, Chaska, Minnesota, USA: Bentley Bactocount IBC-M. Rapid and accurate enumeration of individual bacteria in raw milk. Propagačný materiál. 2003. 4 s.

Do redakcie došlo 1.8.2003.

Laser flow cytometry prospects in the determination of the microbiological quality of raw milk

TOMÁŠKA, M.: *Bull. potrav. Výsk.*, 42, 2003, p. 53-65.

SUMMARY. Laser flow cytometry is utilized as a routine method for the determination of the microbiological quality of raw milk. The principle of the method is that bacterial cells are selectively stained with a dye, they are set to monocell line in a detector where laser excites them and emitted impulses are counted. In comparison to the standard plate method, results from laser flow cytometry are obtained more quickly, with a better precision. To transform the method results from IBC (individual bacterial cells) into the scale of the standard method - CFU (colony forming units), the conversion relationship needs to be established. It must be representative for an area of its future application and it must be verified regularly. However, as laser flow cytometry is based on the different principle as the standard method, the determined microbiological quality may be different. When the conversion relationship is expressed by linear regression, the confidence interval depends mainly on the standard deviation of the regression ($s_{y,x}$).

KEYWORDS: laser flow cytometry; microbiological quality; raw milk