

Pourquoi la technologie Profile-1 est la méthode de mesure de l'Atp bactérien la plus sensible disponible sur le marché?

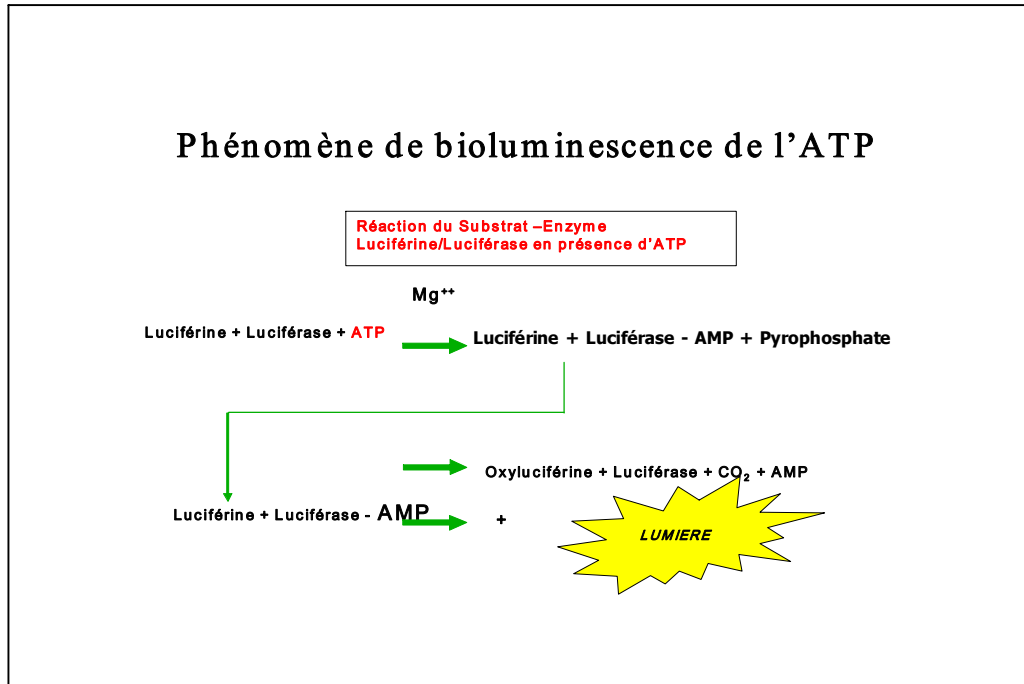
En quoi la technologie PROFILE-1 est –elle différente des autres techniques classiques de mesure de l'Atp par écouvillon ou par filtration?

Contact:
Charles CERVIN
Microbiodetection
2 rue de la Mas
55200 Commercy
www.microbiodetection.com
www.legionelladetection.com

Tel: 03 29 90 95 69
Portable : 06 62 14 81 56
Email: legionellaatp@aol.com



Rappel du principe de détection de la bioluminescence l'Atp.



Toute cellule vivante, y compris les bactéries produisent à l'intérieur de leur cellule de l'atp (Adénosine Triphosphate) utilisé comme source d'énergie dans la cellule. Si cet Atp est libéré de la cellule et mélangé à un extrait de luciférine-luciférase, il se produit une bioluminescence.

Théorie:
Plus il y aurait d'Atp bactérien libéré, plus bioluminescence devrait être importante. Cependant la mesure de l'Atp rapide classique se heurte à de nombreux obstacles pour être suffisamment fiable et suffisamment sensible utilisable (voir ci-dessous)



Problèmes classiques de la mesure de l'Atp total pour l'analyse bactérienne

Écouvillon ou concentration sur filtre toupie handicapée par :

- faux négatifs**
- faux positifs**
- pas de corrélation avec les flores totales sensibles**
- manque de sensibilité (dilution de l'Atp extrait ou volume prélevé insuffisant)**
- extraction sur filtre impraticable sur terrain (trop de manip et de consommables)**

Faux négatifs bioluminescence de l'ATP par écouvillon ou extraction sur filtre-toupie

- % inhibition bioluminescence Atp imprévisible dans échantillon environnemental:
 - nombre et concentration de substances inhibitrices inconnues d'un échantillon à un autre
 - nombreuses substances inhibitrices (ions ferriques, traces de biocides, chélatants, acide humique..)
- Pas d'évacuation du tout ou suffisante des substances inhibitrices avant détection de l'ATP :
 - techniques de concentration des cellules ne rinçant pas les couches de cellules concentrées sur filtre toupie libèrent des substances inhibitrices dans la solution d'extraction
 - La mesure de l'Atp total par écouvillon libèrent les substances inhibitrices (chélatants, ions métalliques, acides humiques fulviques, traces biocides), dans la luciférine-luciférase

Conséquence: bioluminescence réduite voir détruite ou inhibée par substances inhibitrices

- réduction du signal de bioluminescence > 90% (Velasquez et al., 1996)

Faux positifs de l'ATP par écouvillon ou par concentration sur filtre toupie

- Pas de distinction de l'ATP bactérien de l'ATP total et microbien (protozoaires, micro-algues, pollens,..)
- L'ATP non bactérien dépasse largement les valeurs d'ATP bactérien: ATP micro-algue ou pollen > 1000 bactéries ,davantage encore pour les énormes protozoaires
- bioluminescence gonflée par l'ATP libre et/ou l'ATP intracellulaire non bactérien
- pas de corrélation avec les milieux de cultures sensibles: pas publications scientifiques indépendantes disponibles
- Inutilisable pour vérifier efficacité du traitement biocide sur les flores bactériennes thermophiles

Faible représentativité des analyses par écouvillons

Au maximum les écouvillons prélèvent 0,1 ml

Volume insuffisant pour avoir une population bactérienne représentative

- Les bactéries ne sont pas distribuées de façon homogène dans le flacon de prélèvement

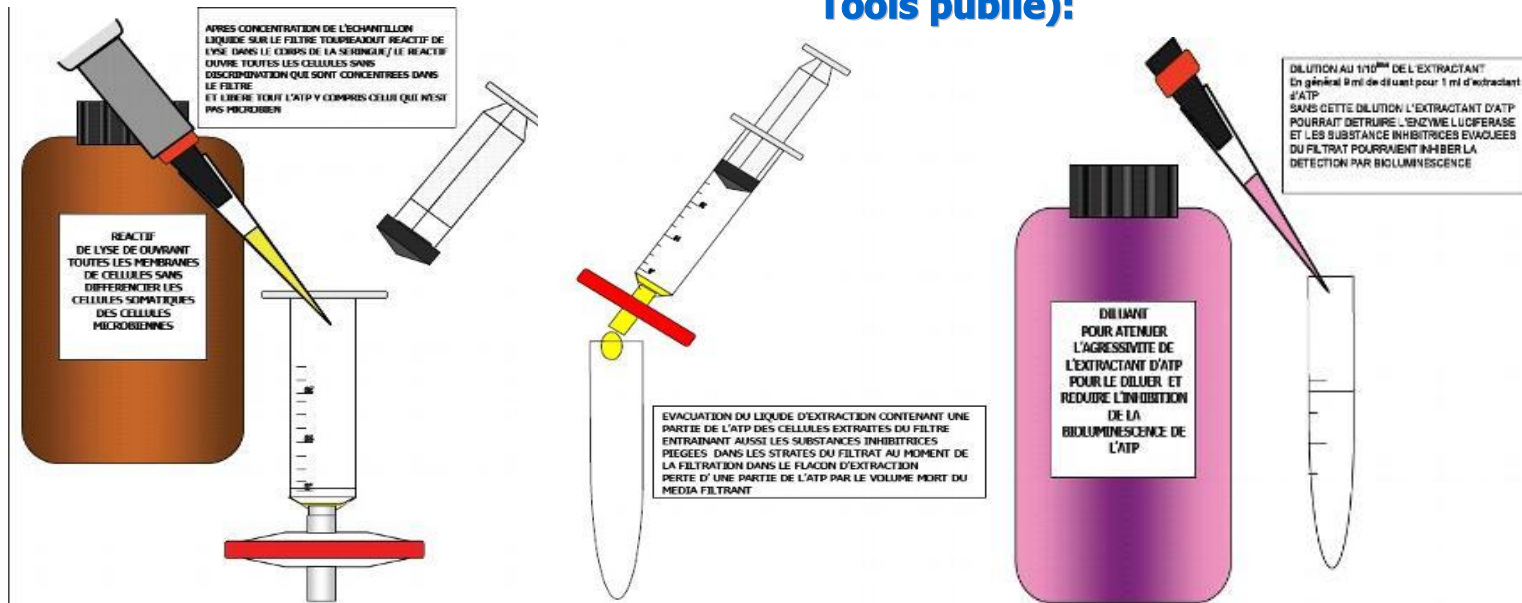
Il faut un volume suffisamment représentatif

- 10 ml est un volume suffisamment représentatif pour avoir une mesure reproductible d'un échantillon à un autre du même point de prélèvement

Un trop faible volume de prélèvement ne permettra pas une analyse suffisamment sensible par Atpmétrie

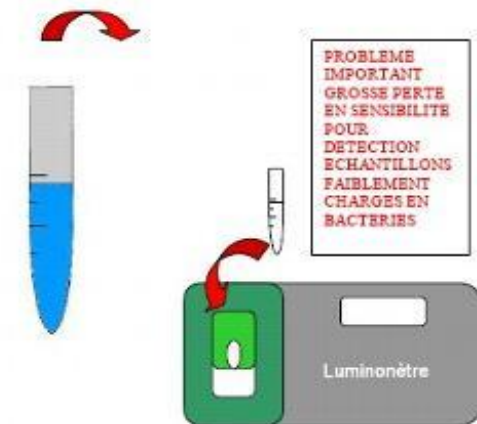
- Si vous avez 500 cellules bactériennes par ml dans votre eau, vous ne détecterez rien en Atpmétrie en prélevant seulement 50 cellules dans votre écouvillon

Illustration de la perte en sensibilité de la mesure de l'Atp par dilution de l'atp extrait sur filtre toupie (basé sur le protocole Aqua-Tools publié):



PRELEVEMENT DE SEULEMENT 100 MICROLITRES SUR UN TOTAL DE 10 ML D'EXTRAIT D'ATP POUR LE METTRE DANS LA CUVETTE DU LUMINOMETRE ON ANALYSE 100 FOIS MOINS D'ATP QUE DANS L'ÉCHANTILLON ORIGINAL

l'extraction d'Atp par concentration cellulaire totale sur filtre-toupie n'analyse pas plus d'1/100ème de l'Atp extrait:



obligé de diluer l'extractant trop agressif pour la mélanger directement à la luciférine-luciférase

dilution au 1/10 ème de l'extractant récupéré (1ml extractant + 9 ml de diluant), dont on ne prélever que 100 microlitres dans la cuvette du bioluminomètre

Signal de bioluminescence 100 fois moins sensible que si l'ensemble de l'Atp extrait pouvait être analysé

sérieux handicap pour analyser les échantillons faiblement chargés en bactéries, même si on augmente les volumes de filtration

Principe de détection brevetée du Profile-1

La cuvette-filtre Filtravette est placée à l'intérieur du Concentrateur cellulaire. Une fois la concentration effectuée des bactéries, le concentrateur est dévissé et la Filtravette est placée sur son support avec buvard



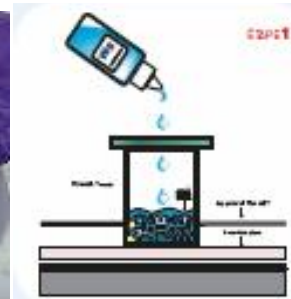
Concentre et lessive le filtrat des substances inhibitrices présente dans les TAR et les réseaux ECS

Détecte la quantité d'Atp intracellulaire des bactéries vivantes de tout l'échantillon sans aucune dilution de l'Atp extrait, et séparément des autres microorganismes présents .

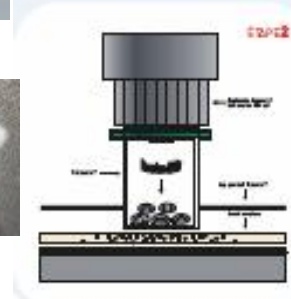
Plus il ya de bactéries dans l'échantillon plus la lumière de la réaction est importante

La technologie Profile-1 mesure cette intensité lumineuse

et détecte <2 min (et <5 min avec concentration 10 ml comprise) le nbre cellules bactériennes viables



Un 1er reactif ouvre les membranes des cellules non microbiennes libère leur Atp qui est évacué avec les substances inhibitrices de la détection de l'Atp à l'aide d'un poussoir à travers la Filtravette absorbé sur un buvard



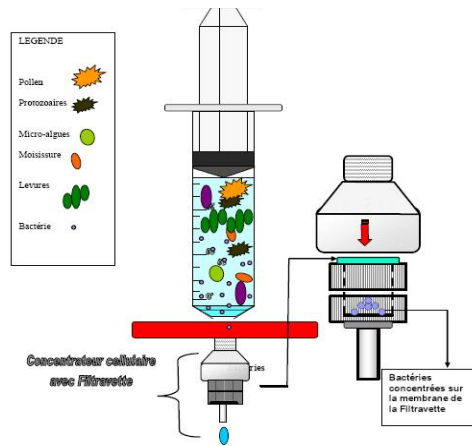
La Filtravette est placée à l'intérieur du tiroir du Profile-1, on ajoute un réactif qui va ouvrir les parois des bactéries et libérer leur Atp dans la solution



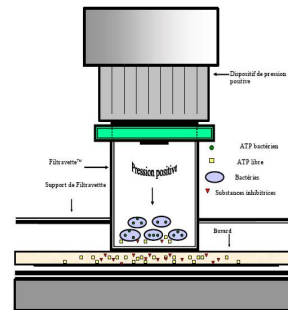
On ajoute et mélange la luciférine-luciférase dans la Filtravette avec l'Atp des bactéries, la réaction de bioluminescence commence. On ferme le tiroir du bioluminomètre, pour mesurer la quantité de lumière produite qui s'affiche sur l'écran digital



Détection ultrasensible technologie brevetée Profile-1: pas de dilution de l'Atp extrait, toutes les bactéries de l'échantillon sont analysées (séparément des protozoaires, micro-algues, pollens, moisissures et levures)



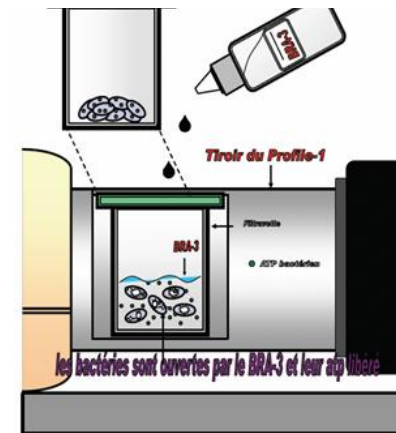
Concentration spécifique des bactéries séparément des autres cellules dans 10 ml de liquide à l'aide d'un le concentrateur cellulaire dévissable incorporant une cuvette-filtre Filtravette brevetée



L'ensemble bactéries sont retenues sur le fonds de la Filtravette, et le filtrat est lessivé de ses substances inhibitrices



Filtravette à l'intérieur du Concentrateur cellulaires



Tout l'Atp des bactéries de l'échantillon est extrait et analysé sans aucune dilution

100 fois plus sensible que les autres méthodes

Comparaison des manips entre Aquatools et MBD après concentration cellulaire (après concentration des bactéries)

Protocole Aquatools

1. Dévisser le filtre-toupie
2. Retirer le piston de la seringue
3. Revisser la seringue
4. Mettre 1 embout sur pipette
5. Prélever 1 ml extractant du flacon d'extractant
6. Ajouter l'extractant dans le corps de la seringue
7. Remettre le piston
8. Préparer un flacon de reception de l'extractant
9. Appuyer sur piston pour extraire l'Atp à travers le filtre-toupie dans le flacon
10. Ouvrir le flacon du diluant
11. Mettre un embout de pipette à une autre pipette
12. Ouvrir le flacon de diluant
13. Prélever 9 ml
14. Ajouter les 9 ml de diluant dans le flacon de l'Atp extrait
15. Visser le flacon
16. Bien mélanger par agitation
17. Rouvrir le flacon contenant l'Atp extrait dilué
18. Prendre une cuvette d'analyse Kikkoman
19. Mettre un embout de micropipette sur pipette
20. Prélever 100 microlitres
21. Ajouter 100 microlitres dans cuvette
22. Ouvrir le flacon contenant la luciférine-luciférase
23. Verser deux gouttes de Luciférine-luciférase
24. Mettre dans le luminomètre Kikkoman et lire le résultat

Protocole de Microbiodetection

1. Dévisser le concentrateur Cellulaire
2. Retirer la Filtravette du Concentrateur
3. La placer sur le support de Filtre
4. Verser 3 gouttes de réactif de lessivage
5. Placer pousoir sur la Filtravette et évacuer le liquide par pression positive sur le buvard
6. Reverser 3 gouttes de réactif de lessivage
7. Placer pousoir sur la Filtravette et évacuer le liquide par pression positive sur le buvard
8. Ouvrir le tiroir et placer la Filtravette dans le bioluminomètre
9. Dévisser le flacon du réactif de lyse microbien
10. Ajouter 2 gouttes du reactif dans la Filtravette
11. Mettre un embout à la micropipette
12. Ouvrir le flacon de luciférine-luciférase
13. Prélever 50 microlitres de LL
14. Verser la LL à l'intérieur de la Filtravette
15. Bien mélanger la LL
16. Fermer le tiroir du bioluminomètre et lire les résultats

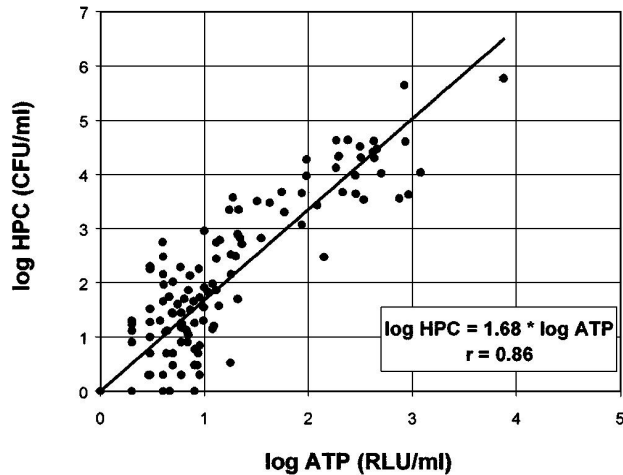
Temps nécessaire 2 minutes

Temps total concentration cellulaire comprise <5 minutes



Profile-1

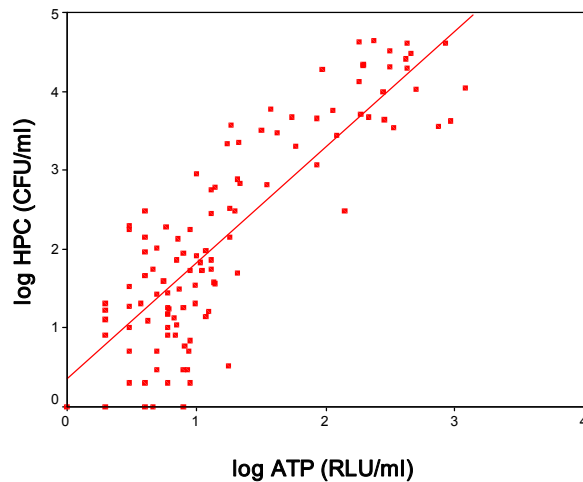
Seule technologie publiée dans études scientifiques indépendantes
corrélée avec flores totales sensibles de l'eau (R2A temps incubation 7-10 jou



Graphiques de corrélation publiés pour
l'analyse de l'eau potable (R2A 7-10 jours)

corrélation en log 10 d'UFC/ml forle totale eau potable
sur gélose R2A et log 10 d'URL/ml du PROFILE-1

publié en 2001 dans Field Analytical Chemistry "Rapid
Determination of Bacteria in Drinking Water Using an
ATP Assay" par Rolf Deininger JiYoung Lee 5(4):1--5,
2001



Corrélation en log 10 ufc/ml des flores totales de
l'eau et log 10 URL/ml

publié en 1999 dans le Journal of Rapid Methods
and Automation in Microbiology volume 7 pages
135-145 dans l'étude "A rapid method for detecting
bacteria in drinking water" (une méthode rapide
pour détecter les bactéries dans l'eau potable) par
JiYoung Lee & Rolf Deininger



Contact

Charles Cervin

Sarl Microbiodetection

2 rue de la Mas

55200 Commercy

Tel: 03 29 90 95 69

Fax pour cdes: 01 77 75 48 92

Portable: 06 62 14 81 56

Email: legionellaatp@aol.com

www.microbiodetection.com

