

Využití metody ELFA při stanovení bakterií *Salmonella* spp. v potravinách

Chemie a mikrobiologie potravin, III. ročník
Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE, VFU Brno
Říjen 2013



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Technika ELFA

- Enzyme Linked Fluorescent Assay
- Enzymová screeningová technika založená na imunologických testech (EIA)
- Vznik imunokomplexu Ab - Ag



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Přístroj VIDAS®/miniVIDAS®

- bioMérieux sa, Francie
- Vitek Immuno Diagnostic Assay System



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Využití VIDAS®

- Viry hepatitidy A a B
- Virus EBV
- Virus HIV
- *Clostridium difficile*
- BCH markery (rakovina, nemoci KVS....)



Využití - mikrobiologie potravin

- *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella* spp.
- *E. coli* O157:H7
- *Campylobacter* spp.
- Enterotoxiny *S. aureus*



L. monocytogenes

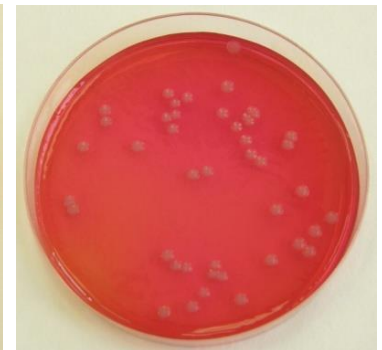
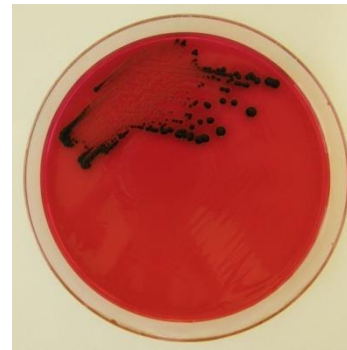
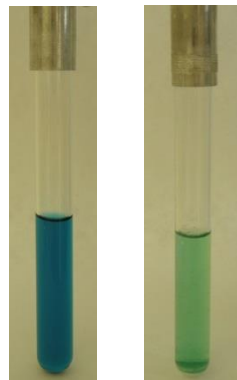
Salmonella spp.

- G-; č. *Enterobacteriaceae*
- Fakultativně anaerobní
- Nesporotvorné tyčinky
- GLU+, KAT+, OXI-, H₂S+, INDOL-
- Redukce nitrátů na nitrity
- Původce alimentární toxoinfekce
- Přes 2400 sérovarů



Detekce *Salmonella* spp.

- Detekce časově náročná (až 5 dnů)
 - PPV ⇒ RVS, MKTTn ⇒ XLD, BR ⇒ konfirmace
- Hledání alternativních rychlejších metod



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VIDAS[®] *Salmonella* (SLM)

- Detekce salmonely v prostředí
- Detekce salmonely v potravinách:
 - vejce
 - hovězí, vepřové, drůbeží maso
 - ryby, plody moře
 - mléčné výrobky, sýry, sušené mléko
 - cukrovinky, čokoláda, ovocné džusy
 - ovoce, zelenina, koření, ořechy
 - sojová mouka, kvasnice, želatina, těstoviny



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VIDAS[®] *Salmonella* (SLM)

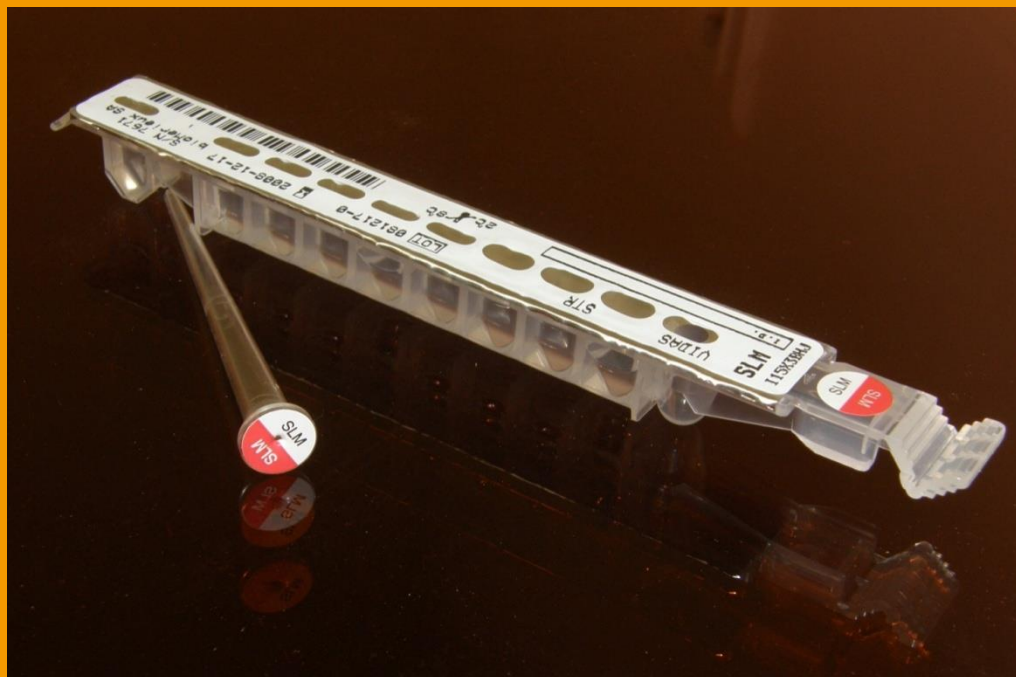
- Automatizovaný EIA test
- Využívá směs vysoce specifických protilátek proti O (somatickým, lipopolysacharidovým) a H (bičíkovým, proteinovým) Ag
- Detekce pohyblivých i nepohyblivých salmonel



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Složení testu

- Komůrka s pevnou fází (SPR[®]) „pipeta“ (The Solid Phase Receptacle)
- Reagenční strip



SPR[®]

- SPR[®] slouží jako pevná fáze + pipetovací pomůcka
- Na vnitřní plochu SPR[®] jsou během výroby adsorbovány protilátky proti povrchovým Ag salmonel
- Reakční médium je opakovaně vháněno dovnitř SPR[®] a ven



Reagenční strip



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 nanesení
vzorku

2 – 5
promývání

6 Ab+ALP

7 – 9
promývání

10 optická
kyveta



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

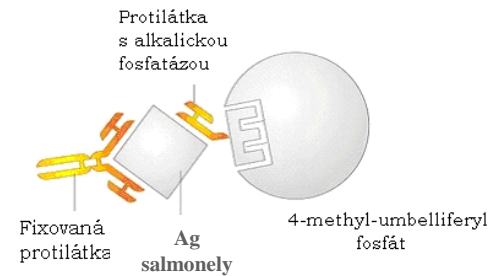
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Reagenční strip



- 10 jamek:
 - 1. jamka pro vzorek:
aplikuje se 500 µl obohacené půdy/standardu/kontroly
 - 2. jamka – předmývací roztok:
fyziolog. roztok pufovaný TRIS (TBS), Tween, konzervans
 - 3., 4., 5., 7., 8., 9. jamka - promývací roztok:
TBS, Tween, konzervans
 - 6. jamka – konjugát: Ab+ALP, konzervans
 - 10. jamka – odečítací kvjeta se substrátem:
4-methylumbelliferylfosfát, diethanolamin, konzervans

Princip



- Ag salmonel přítomné v médiu se naváží na Ab v SPR[®]. Nenavázané složky se odstraní během promývacích kroků.
- Ab konjugované ALP se váží na imunokomplex Ag salmonel + Ab v SPR[®]
- Nenavázaný konjugát je vymyt promývacími kroky
- S = 4-methylumbelliferylfosfát reaguje s ALP
- ALP katalyzuje hydrolýzu S na fluorescenční produkt 4-methylumbelliferon
- Měření fluorescence fotodiodovým fluorimetrem při 450 nm
- Výsledek: **POZITIVNÍ / NEGATIVNÍ**

Umístění stripů a SPR®

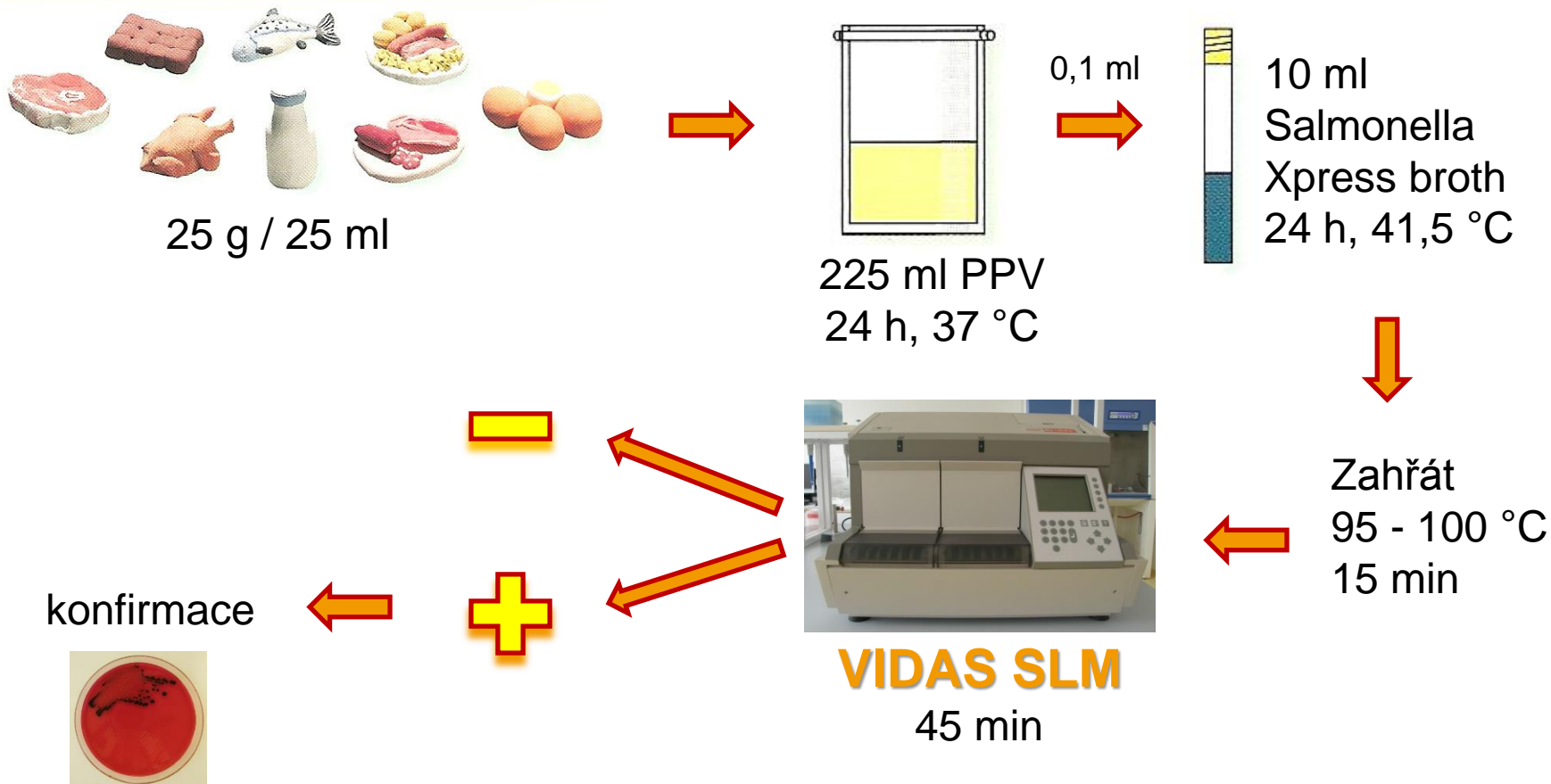


Vložení stripů



Vložení SPR

Protokol VIDAS[®] Salmonella (SLM)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



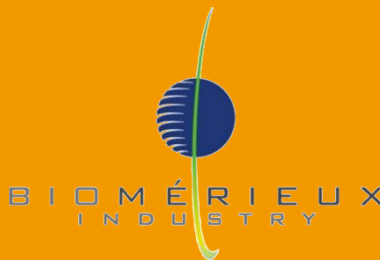
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VIDAS[®] UP *Salmonella* (SPT)

- Vnitřek SPR[®] je potažen proteiny specifickými pro receptory salmonel k bakteriofágům
- Konjugát: bílkoviny specifické pro receptory salmonel označené alkalickou fosfatázou
- Detekce pohyblivých i nepohyblivých salmonel



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



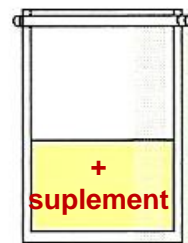
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Protokol VIDAS[®] UP *Salmonella* (SPT)



25 g / 25 ml



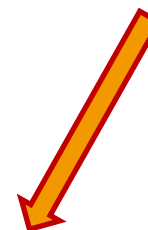
225 ml PPV
18 - 24 h, 41,5 °C

1 ml



MLÉČNÉ VÝROBKY

10 ml SX2
6 - 8 h, 41,5 °C



Zahřát
95 - 100 °C
5 min

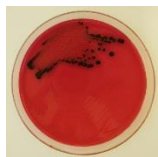


VIDAS SLM

48 min



konfirmace



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VIDAS[®] *Salmonella* (SLM)

- Metoda certifikována AFNOR VALIDATION (BIO 12/16-09/05) jako alternativní metoda analýzy pro všechny produkty určené lidské výživě nebo jako krmivo a pro vzorky prostředí (vyjma primární produkce).



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VIDAS[®] UP *Salmonella* (SPT)

- Metoda certifikována NF VALIDATION (BIO-12/32-10/11) jako alternativní metoda pro analýzu všech potravin pro lidskou spotřebu (kromě sýrů z nepasterovaného mléka), zvířecích krmiv a vzorků výrobního prostředí.
- Ověřeno certifikací AFNOR Certification



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Děkuji za pozornost

