



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

Detekce listerií v potravinách a environmentálních vzorcích metodou 3M™ Tecra™ Listeria Visual Immunoassay

1. Popis metody

3M™ Tecra™ Listeria Visual Immunoassay je rychlý a specifický orientační test k presumptivní detekci bakterií *Listeria* spp. v potravinách a environmentálních vzorcích. Tímto testem nelze odlišit patogenní *L. monocytogenes* od ostatních druhů listerií. Detekční limit metody je stanoven na 1-5 buněk listerií v 25 g vzorku (resp. na odběrovém tamponu), a to v závislosti na jejich sérotypu. Presumptivně pozitivní výsledky je třeba vždy potvrdit standardní metodou (kultivace, biochemické a sérologické testy).

2. Pracovní postup

2.1. Příprava činidel testu

Je nutné zamezit křížové kontaminaci činidel. Při rozpouštění činidlo jemně promícháváme převrácením, do úplného rozpuštění ponecháme při teplotě 20-25 °C. Nikdy prudce neprotřepávat! Po rozpouštění zapíšeme datum přípravy na štítek lahvičky.

1. Wash Concentrate: promývací roztok se připraví naředěním Wash Concentrate s 2 l destilované vody (tj. 1,25 ml Wash concentrate + 100 ml destilované vody). Použitelnost 2 měsíce od naředění.
2. Positive Control: do lahvičky Positive Control napipetujeme 3 ml Negative Control.
3. Conjugate: do lahvičky Conjugate přidáme obsah lahvičky Conjugate Diluent. Použitelnost 1 měsíc po rozpuštění.
4. Substrate: do lahvičky Substrate přidáme obsah lahvičky Substrate Diluent. Použitelnost 2 měsíce po rozpuštění.

2.2. Příprava vzorku – potraviny

Vždy dbáme na to, aby pomnožovací média byla předem předežhřátá na uvedenou teplotu inkubace.

Používaná pomnožovací média:

FB Fraser Broth

UVM University of Vermont Broth

LEB Listeria Enrichment Broth

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2.2.1. Mléčné výrobky

homogenizace 25 ml (25 g) vzorku + 225 ml LEB
inkubace při 30 °C, 24 hodin



1 ml + 9 ml FB
inkubace 30 °C, 24 hodin



ELISA

2.2.2. Maso a masné výrobky

homogenizace 25 g vzorku + 225 ml UVM
inkubace při 30 °C, 24 hodin



0,1 ml + 9,9 ml FB
inkubace 30 °C, 24 hodin



ELISA

2.2.3. Ostatní potraviny

homogenizace 25 ml (25 g) vzorku + 225 ml LEB
inkubace při 30 °C, 24 hodin



0,1 ml + 9,9 ml FB
inkubace 30 °C, 24 hodin



ELISA

2.2.4. Vzorky z prostředí

stěrový tampon + 20 ml UVM
inkubace při 30 °C, 48 hodin



ELISA

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2.3. Pracovní postup - ELISA

1. Před zahájením práce zajistíme vytemperování všech činidel testu na laboratorní teplotu (tj. 20-25 °C).
2. Tepelná inaktivace vzorků: do zkumavky Eppendorf napipetujeme 50 µl Sample Aditive (činidlo 10) a 1 ml pomnoženého vzorku, promícháme a tepelně inaktivujeme v suché lázni 15 minut při 100 °C. Provedeme pro každý testovaný vzorek
3. Příprava jamek: do rámečku umístíme potřebný počet jamek s navázanými protilátkami, a to podle počtu vzorků + pozitivní kontrola + negativní kontrola.
4. Nanesení a inkubace vzorků: do jamek v rámečku pipetujeme postupně 200 µl každého vzorku, na závěr potom 200 µl pozitivní a 200 µl negativní kontroly. Na každý vzorek, resp. kontrolu, použijeme novou špičku. Jamky překryjeme parafilmem (ochrana proti odpařování) a inkubujeme 30 minut při 37 °C.
5. První promytí: rychlým převrácením vylijeme obsah jamek do nádoby na odpad, následně převráceným rámečkem několikrát důrazně klepneme na silnou vrstvu buničité vaty. Pomocí stříčky naplníme všechny jamky až po okraj promývacím roztokem, pozor na vzduchové bubliny. Jamky takto promyjeme a vyprázdníme celkem 3x.
6. Přidání konjugátu a inkubace: do každé prázdné jamky napipetujeme 200 µl konjugátu, jamky překryjeme parafilmem (ochrana proti odpařování) a inkubujeme 30 minut při 37 °C.
7. Druhé promytí: rychlým převrácením vylijeme obsah jamek do nádoby na odpad, následně převráceným rámečkem několikrát důrazně klepneme na silnou vrstvu buničité vaty. Pomocí stříčky naplníme všechny jamky až po okraj promývacím roztokem, pozor na vzduchové bubliny. Jamky takto promyjeme a vyprázdníme celkem 4x.
8. Přidání substrátu: do každé prázdné jamky napipetujeme 200 µl substrátu a inkubujeme 15 minut při 20-25 °C.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

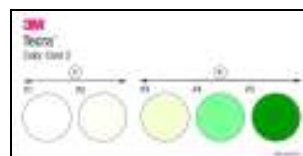
9. Hodnocení barvy pozitivní kontroly: jemně poklepeme na rámeček, aby se barva rovnoměrně rozmíchala, barva pozitivní kontroly musí být alespoň stejně tmavá jako barva č. 4 na vyhodnocovací šabloně (Color Card 2). Není-li barva pozitivní kontroly dostatečná, pokračujeme v inkubaci. Pokud ani po 30 minutách nedosáhne pozitivní kontrola potřebného zbarvení, stanovení je neplatné a výsledky testu nelze použít.



10. Přidání Stop Solution: do každé jamky napipetujeme 20 µl Stop Solution, opatrně promícháme a do 30 minut odečteme výsledky. (krok není povinný)



11. Interpretace výsledků: porovnáme barvu každé jamky s vyhodnocovací šablonou (Color Card 2). Pozitivní kontrola musí být přinejmenším stejně tmavá jako barva č. 4 a negativní kontrola nesmí být tmavší než barva č. 2, jinak je stanovení neplatné.



Pozn.: Použité obrázky jsou převzaty se souhlasem firmy NOACK, spol. s r.o. z návodu k provedení testu 3M™ Tecra™ Listeria Visual Immunoassay

2.4. Konfirmace presumptivního výsledku

1. Presumptivně pozitivní výsledky je třeba vždy potvrdit standardní metodou (ČSN EN ISO 11290-1).
2. Provedeme vyočkování z primárního i sekundárního pomnožení na půdy ALOA a PALCAM, naočkované misky inkubujeme při 37 °C po dobu 24, resp. 48 hodin.
3. Po ukončení inkubace hodnotíme přítomnost suspektních kolonií *L. monocytogenes*. Po 24 hodinách roste *L. monocytogenes* na ALOA agaru v modrozelených koloniích obklopených širokou neprůhlednou kruhovou zónou precipitace (tzv. haló zóna). Na PALCAM agaru roste *L. monocytogenes* v drobných šedozelených či olovových koloniích a v jejich okolí dochází k hnědnutí/černání média, po delší době inkubace mají kolonie propadlý střed.
4. Z každé Petriho misky odebereme 5 suspektních kolonií k biochemické, příp. i sérologické konfirmaci.

3. Uchovávání a likvidace

Všechny součásti testovací sady, včetně promývacího roztoku, uchováváme při teplotě 2-8 °C. Nepoužité jamky ukládáme do uzavíratelného sáčku, nesmí zmraznout.

Při rozpouštění činidel testu je nutno zapsat datum na štítek lahvičky. Po rozpouštění činidla použijeme nejpozději za: 1 měsíc – konjugát, 2 měsíce – ostatní činidla.

Po ukončení testu zlikvidujeme všechny vzorky a použité jamky vhodným způsobem.