

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

KA 2340/1-6 Využití metody ELISA při detekci *Listeria monocytogenes* a stafylokokových enterotoxinů v potravinách

B. Využití metody 3M™ Tecra™ Staph Enterotoxin VIA při detekci stafylokokových enterotoxinů v sýrech

1. Princip metody

Všechny imunologické metody jsou založeny na vysoce specifické vazebné reakci mezi antigenem a protilátkou. Pro metodu ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je typické a) značení detekčních protilátek pomocí enzymů, které katalyzují přeměnu substrátu na barevný produkt; b) adsorbce protilátek na vhodný nosič (zkumavka, jamka mikrotitrační destičky, atd.). Vyhodnocení metody je vizuální nebo spektrofotometrické.

V komerčních testech se nejčastěji využívá tzv. sandwich ELISA, kdy jsou na detekovaný antigen navázány 2 protilátky – imobilizovaná a enzymaticky značená (viz schéma 1).

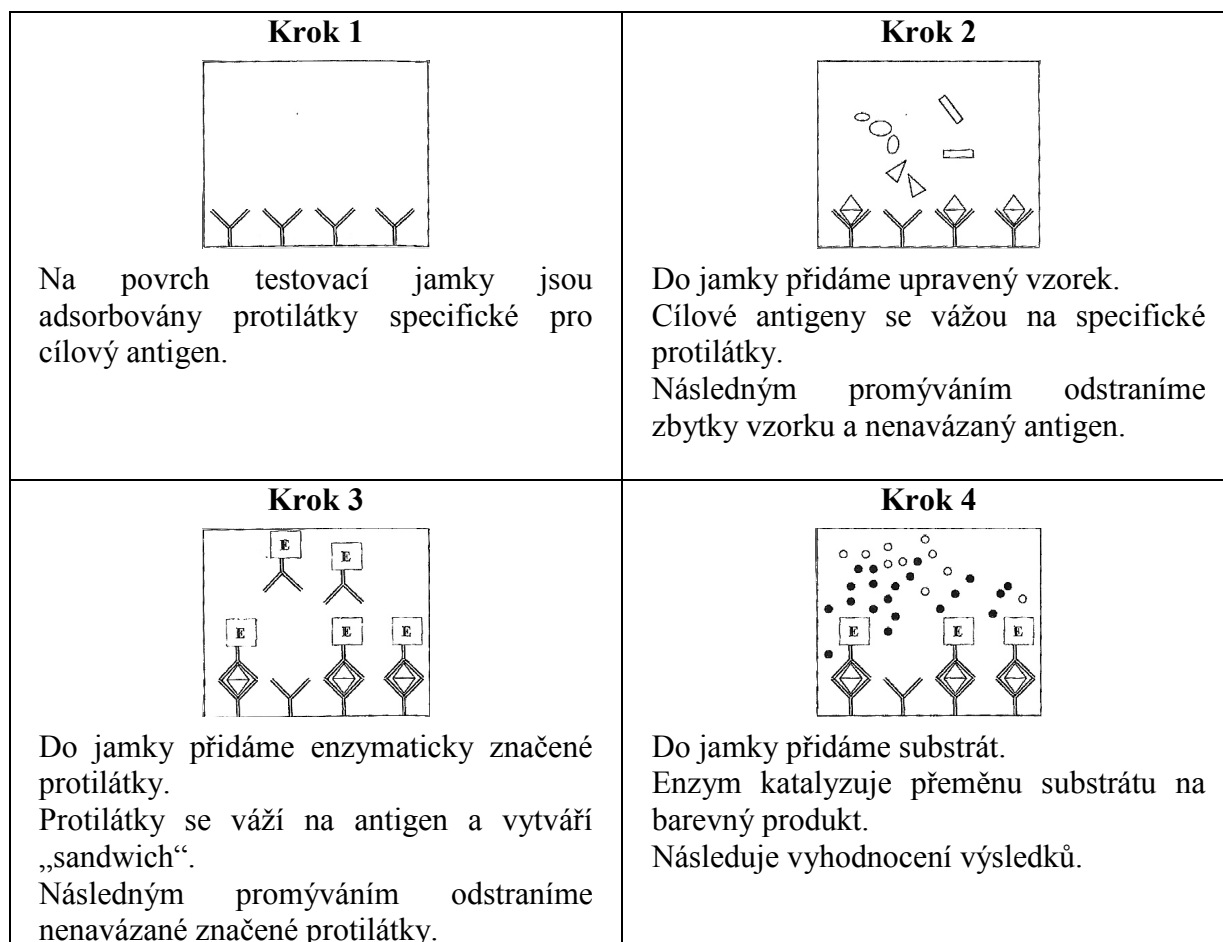


Schéma 1: Hlavní kroky sandwich ELISA. (zdroj: McMEEKIN, TA. *Detecting pathogens in food*. 1st ed. Abington: Woodhead Publishing Limited, 2003, 370 p.)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2. Popis metody

3M™ Tecra™ Staph Enterotoxin VIA je rychlý a specifický orientační test k presumptivní detekci stafylokokových enterotoxinů (typy A, B, C₁, C₂, C₃, D a E) ve vzorcích potravin. Použitou metodou nelze odlišit jednotlivé typy enterotoxinů.

Detekční limit metody je stanoven na 1 ng/ml extraktu vzorku, hodnota může kolísat podle typu enterotoxinů.

3. Pracovní postup

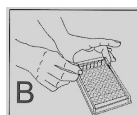
Stafylokokové enterotoxiny se váží na sklo. Nádoby a ostatní vybavení musí být vyrobeny z materiálu, na který se toxin neváže. Doporučené je použití polypropylenových nádob a při stanovení pH lakmusových papírků.

3.1. Zpracování vzorku

1. Do sterilního homogenizačního sáčku odvážíme 10 g testovaného mléčného výrobku a přidáme 50 ml Tris pufru, vzorek homogenizujeme na stomacheru.
2. Homogenát přelijeme do polypropylenové centrifugační zkumavky a pomocí 10M HCl upravíme pH na hodnotu 4, k měření pH použijeme lakmusový papírek.
3. Zkumavku odstředíme při 1 000 - 3 000g po dobu 10 minut. Supernatant přefiltrujeme pomocí upravené stříkačky do nové polypropylenové zkumavky.
4. pH eluátu upravíme 1M NaOH na hodnotu 7-8.
5. Do zkumavky Eppendorf napipetujeme 1 ml eluátu, přidáme 50 µl Sample Additive a důkladně promícháme.
6. Provedeme detekci stafylokokových enterotoxinů metodou ELISA (3M™ Tecra™ Staph Enterotoxin VIA).

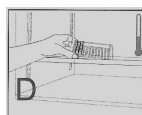
3.2. Pracovní postup 3M™ Tecra™ Staph Enterotoxin VIA

1. Před zahájením práce zajistíme vytemperování činidel testu na laboratorní teplotu (tj. 20–25 °C).
2. **Příprava jamek:** do rámečku umístíme potřebný počet jamek s navázanými protilátkami, a to podle počtu vzorků + pozitivní kontrola + negativní kontrola.
3. **Navlhčení jamek:** každou z jamek naplníme promývacím roztokem a necháme stát 10 minut při laboratorní teplotě. Poté rychlým převrácením vylijeme obsah jamek do nádoby na odpad, následně převráceným rámečkem několikrát důrazně klepneme na silnou vrstvu buničité vaty.

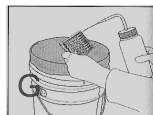
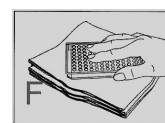


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

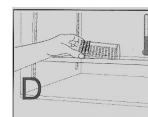
4. **Nanesení a inkubace vzorků:** do jamek v rámečku pipetujeme postupně 200 μ l každého inaktivovaného vzorku, na závěr potom 200 μ l pozitivní a 200 μ l negativní kontroly. Na každý vzorek, resp. kontrolu, použijeme novou špičku. Jamky překryjeme parafilmem (ochrana proti odpařování) a inkubujeme 2 hodiny při 37 °C.



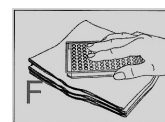
5. **První promytí:** rychlým převrácením vylijeme obsah jamek do nádoby na odpad, následně převráceným rámečkem několikrát důrazně klepneme na silnou vrstvu buničité vaty. Pomocí stříčky naplníme všechny jamky až po okraj promývacím roztokem, pozor na vzduchové bubliny. Jamky takto promyjeme a vyprázdníme celkem 4x.



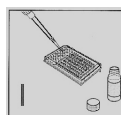
6. **Přidání konjugátu a inkubace:** do každé prázdné jamky napipetujeme 200 μ l konjugátu, jamky překryjeme parafilmem (ochrana proti odpařování) a inkubujeme 1 hodinu při 20-25 °C.



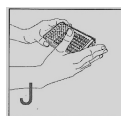
7. **Druhé promytí:** rychlým převrácením vylijeme obsah jamek do nádoby na odpad, následně převráceným rámečkem několikrát důrazně klepneme na silnou vrstvu buničité vaty. Pomocí stříčky naplníme všechny jamky až po okraj promývacím roztokem, pozor na vzduchové bubliny. Jamky takto promyjeme a vyprázdníme celkem 5x.



8. **Přidání substrátu:** do každé prázdné jamky napipetujeme 200 μ l substrátu, a inkubujeme 30 minut při laboratorní teplotě (20-25 °C).

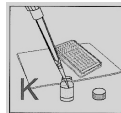


9. **Hodnocení barvy pozitivní kontroly:** jemně poklepeme na rámeček, aby se barva rovnoměrně rozmíchala, barva pozitivní kontroly musí být alespoň stejně tmavá jako barva č. 4 na vyhodnocovací šabloně (Color Card 2). Není-li barva pozitivní kontroly dostatečná, prodloužíme inkubaci na 45 minut. Pokud ani po 45 minutách nedosáhne pozitivní kontrola potřebného zbarvení, stanovení je neplatné a výsledky testu nelze použít.

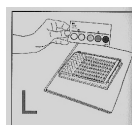


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

10. Přidání Stop Solution: do každé jamky napipetujeme 20 μ l Stop Solution, opatrně promícháme a do 30 minut odečteme výsledky. (krok je nepovinný)



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 (VIA)

Po ukončení testu zlikvidujeme všechny vzorky obsahující toxin (včetně pozitivních kontrol) a použité jamky namočením do 2% chlornanu sodného na dobu 30 minut.