



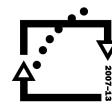
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

Detekce stafylokokových enterotoxinů metodou 3M™ Tecra™ Staph Enterotoxin VIA

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

2. 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 lakmusových papírků.

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 rozpuštění 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 polypropylenové zkumavky s 4,95 ml promývacího roztoku přidáme 50 µl pozitivní kontroly. Připravujeme denně čerstvě!
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 - izolát *S. aureus*

1. Testovaný izolát (24-hodinová kultura na krevním agaru) inokulujeme do Tecra Staphylococcus Growth Medium a kultivujeme při 37 °C po dobu 18-20 hodin. S ohledem na možnou vazbu toxinů na sklo používáme 10 ml PP centrifugační zkumavky.
2. Do mikrozukavky Eppendorf napipetujeme 1,5 ml promíchané pomnožené kultury, odstředíme 10 min při 8 000 rpm.
3. Do druhé mikrozukavky Eppendorf opatrně odpipetujeme 1 ml supernatantu a upravíme pH na hodnotu 7-8, pH měříme pomocí lakmusového papírku.
4. K 1 ml supernatantu přidáme 50 µl Sample Additive a důkladně promícháme.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2.3. Příprava vzorku - potraviny

Vzorek ^a	Krok 1: Hydratace ^b a míchání vzorku	Krok 2: Kyselá precipitace ^c	Krok 3: Odstředění vzorku	Krok 4: Filtrace vzorku ^d a úprava pH	Krok 5: Přidání Sample Additive
Sušené mléko	Hydratujeme podle pokynů výrobce nebo smícháme 10 g s 50 ml Tris pufru.	není	není	Filtrace není zapotřebí. Upravíme pH vzorku na 7-8.	Pečlivě promícháme 1 ml vzorku s 50 µl Sample Additive.
Kojenecké mléko	Smícháme 10 g se 40 ml vody.	Upravíme pH na hodnotu 4 pomocí 10M HCl.	Odstředíme 15 min při 25 000g.	Přefiltrujeme supernatant pomocí upravené stříkačky. Upravíme pH eluátu na 7-8.	Pečlivě promícháme 1 ml eluátu s 50 µl Sample Additive.
Jiné sušené výrobky	Smícháme 10 g s 50 ml Tris pufru.	není	Odstředíme 10 min při 1 000 – 3 000g.	Přefiltrujeme supernatant pomocí upravené stříkačky. Upravíme pH eluátu na 7-8.	Pečlivě promícháme 1 ml eluátu s 50 µl Sample Additive.
Sýr a uzený losos, potraviny ve strouhance či těstíčku	Smícháme 10 g s 50 ml Tris pufru.	Upravíme pH na hodnotu 4 pomocí 10M HCl.	Odstředíme 10 min při 1000 – 3000g.	Přefiltrujeme supernatant pomocí upravené stříkačky. Upravíme pH eluátu na 7-8.	Pečlivě promícháme 1 ml eluátu s 50 µl Sample Additive.
Tekuté mléko	není	není	není	Filtrace není zapotřebí. Upravíme pH vzorku na 7-8.	Pečlivě promícháme 1 ml vzorku s 50 µl Sample Additive.
Jiné potraviny	Smícháme 10 g s 20 ml Tris pufru.	není	Odstředíme 10 min při 1000 – 3000g.	Přefiltrujeme supernatant pomocí upravené stříkačky. Upravíme pH eluátu na 7-8 ^e .	Pečlivě promícháme 1 ml eluátu s 50 µl Sample Additive.

Poznámky:

- vzorky s vysokou peroxidázovou aktivitou mohou způsobit falešně pozitivní výsledky
- sušené potraviny je třeba 30 minut před mixováním namočit
- při úpravě pH pozor na pokles hodnoty pod 3, může dojít k denaturaci toxinů
- 0,5-1,0 cm silný vatový tampón vložíme do 25 ml jednorázové plastové stříkačky, do stříkačky nalijeme 5 ml destilované vody a pístem ji protlačíme, aby vznikla tuhá vatová zátka, na každý vzorek použijeme novou stříkačku
- pokud po kroku 4 nezískáme průzračný a neviskózní eluát, je nutno u nově připraveného vzorku zařadit kyselou precipitaci

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2.4. Pracovní postup - ELISA

1. Před zahájením práce zajistíme vytemperování všech 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.
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 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 µl 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 µl substrátu a inkubujeme 30 minut při 20-25 °C.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

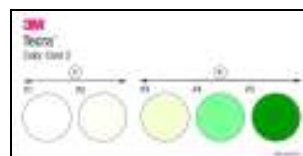
9. Hodnocení barvy pozitivní kontroly: jemně poklepeme na rámeček, aby se barva rovnoměrně rozmíchala, barva pozitivní kontroly musí být alespoň stejně tmavá jako barva č. 4 na vyhodnocovací šabloně (Color Card 2). Není-li barva pozitivní kontroly dostatečná, pokračujeme v inkubaci. Pokud ani po 45 minutách 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™ Staph Enterotoxin VIA

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 den – pozitivní kontrola, 1 měsíc – konjugát, 2 měsíce – ostatní činidla.

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