



Validace imunochemických metod pro identifikaci hovězího masa v tepelně opracovaných potravinách



Milena Kmínková, Alexandra Prošková, Jiří Kučera
Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař

Úvod

Identifikace masa různého druhového původu v potravinářských výrobcích je důležitá jak z hlediska falšování dražších druhů mas levnějšími, tak z důvodu zvyšujícího se množství potravinových alergií. Byly vyhodnoceny imunochemické metody identifikace tepelně opracovaných bílkovin živočišného původu v potravinářských výrobcích. Pro smíšené tepelně opracované výrobky nelze použít metodu nativní elektroforézy, neboť detekce takto rozdělených bílkovin není dostačující pro identifikaci druhů a jsou tedy nutné metody imunochemické.

Imunochemické soupravy ELISA od dvou výrobců byly validovány a porovnány vzhledem k imunitní odezvě na hovězí maso v tepelně opracovaných masných výrobcích. U obou souprav **ELISA Tek** a **Tepnel Biosystems**, které jsou specifické pro hovězí maso, jsme stanovili **sensitivitu** (mez detekce – LOD= Limit of Detection), **specifitu**, **selektivitu** a **aplikovatelnost**.

Materiál a metody

Komerční soupravy Elisa :

Elisa Tek, USA a Elisa Tepnel Biosystems, UK
Vzorky - zmrazené konzervy s rozemletým masem :

- jedním druhem masa,
- několika druhy a s přidavkem rostlinných bílkovin- vzorky S1-S7, obsahují maso hovězí, vepřové, kuřecí, krůtí, kachní, jehněčí, a koňské v každém vzorku různé množství, dohromady 47,5%.
- Procentické složení – viz obr. 1 v legendě k obrázkům
- speciálními výrobky s několika druhy masa a různými přísadami ve formě paštiky (Leb1, Leb2), hamburgerů (Ham1 a Ham 2), uzený výrobek (S26)

Chemikálie byly chemicky čisté.
Spektrofotometr pro mikrodestičky-Sunrise, Tecan, Rakousko
Software na vyhodnocování naměřených dat – Magellan
Homogenizátor- Euroturax T20 Standard, 27 000ot/min, IKA, Německo
Stolní odstředivka- Hettich 32R, Německo

Validace

Sensitivita – Zjištění nejnižší hladiny analytu, která ještě dává pozitivní signál –mez detekce (LOD-Limit of Detection)

Specificita –Určení species a subspecies, které samostatně dávají pozitivní reakci a species a subspecies, které dávají negativní reakci, bez ovlivnění ostatními složkami potravy.

Selektivita –Zjištění jakékoliv interference ostatních species, která vede k dvojnásobnému signálu, který není způsoben předpokládaným signálem analytu při vyšetřování.

Aplikovatelnost – Demonstrace aplikovatelnosti metody v potravinářských výrobcích.

Příprava extraktu:

Postup

- pro Elisa Tek : podle požadavků soupravy jsme připravili extrakty ze vzorků v poměru směs : roztok 0,9% NaCl = 1:2 a extrakty z jednoho druhu masa, které budou sloužit jako negativní a pozitivní kontrola, v poměru samostatný druh : roztok 0,9% NaCl = 1:3.
- pro Biosystems Tepnel podle požadavků soupravy jsme připravili extrakty ze vzorků v poměru vzorek : roztok 0,9% NaCl = 1:4

Dále stejný postup pro obě soupravy :

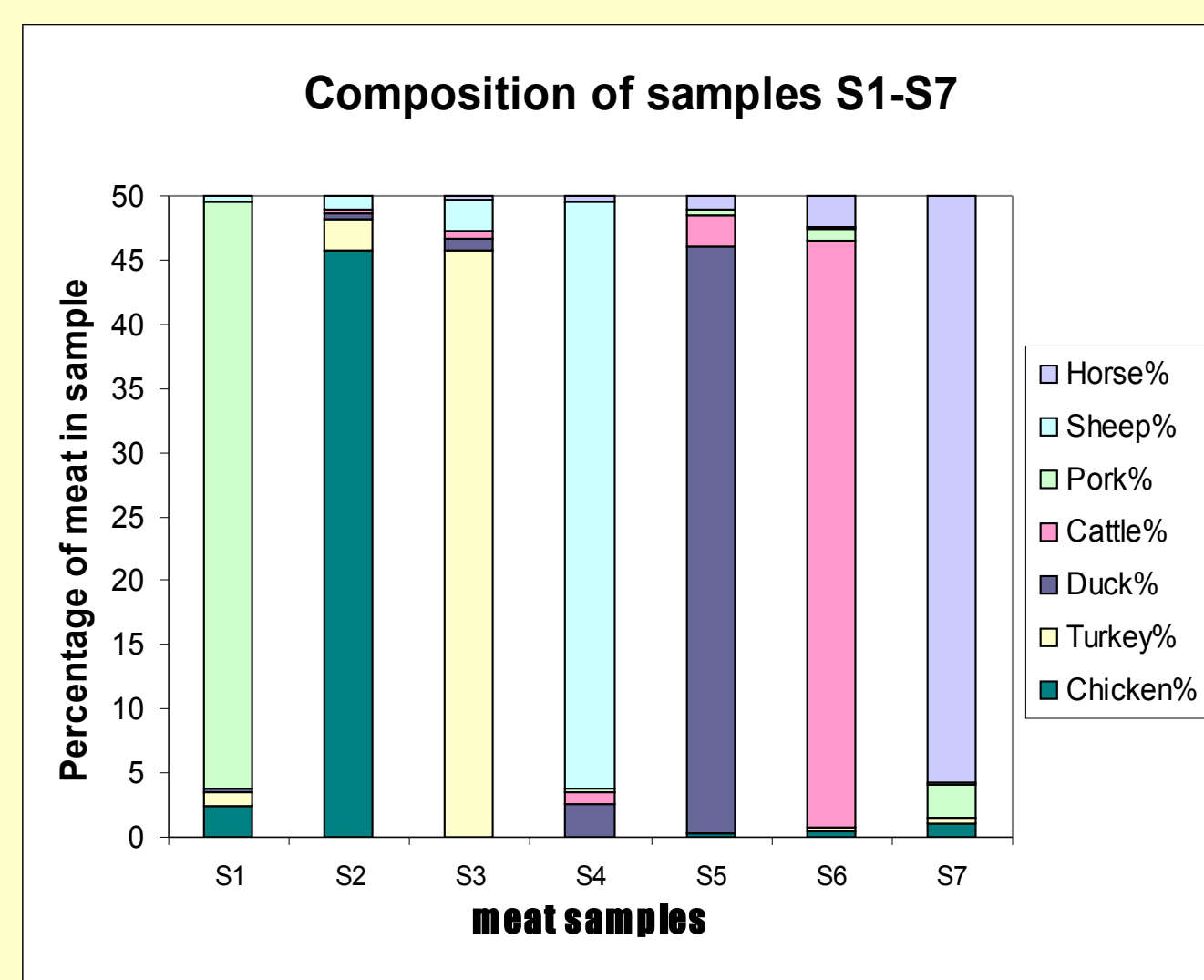
Po částečném rozmrazení se 10 g drobně nakrájeného vzorku z konzervy + 20 (30, 40) ml 0,9% roztoku NaCl homogenizuje 20 sec při 27 000ot/min, nechá se stát 60 min v klidu při pokojové teplotě a pak se centrifuguje při 15 300xg po dobu 15 min. Poté se filtruje přes hustý filtrační papír, druh č. 390.

Výrobky S1-S7 a Leb1,2, Ham1,2 byly tepelně opracované ve výrobním procesu jen na 75°C (teplota v jádru 72°C), a proto musely být znovu zahřáté na teplotu 95°C po dobu 15 min, jak to vyžaduje souprava.

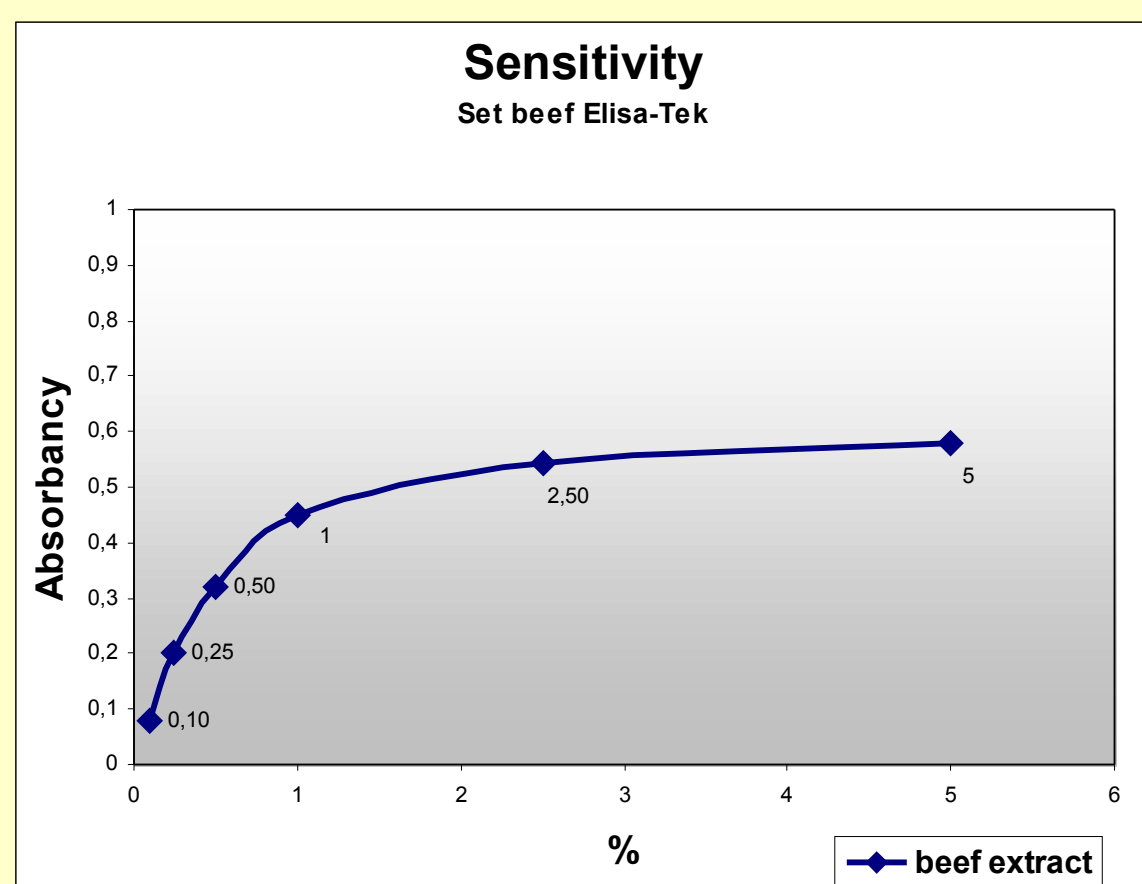
Imunoreakce

Soupravou se identifikují druhy zvířecích tkání, použitých jako doplňky ve vařených a konzervovaných masových potravinách s použitím jednoduché extrakce vzorku a aplikace dvojité sendvičové ELISA metody. Množství tepelně odolné bílkoviny ve vzorku, vázaného k protilátce v jamce destičky je stanoveno nejprve imunoreakcí s biotinylovanou protilátkou, která se identifikuje přes vazbu avidin-biotin enzymatickou reakcí peroxidasy konjugované na avidin. Substrátem je ABTS - 2,2 azino-di-(3-ethylbenzthiazoline) sulphonic acid. Vzniklá zelená barva (reakce se ukončí fluoridem sodným), se měří při 415 nm. Vzniklá barva je proporcionální k původnímu množství specifického antigenu v extraktu. Postup imunoreakce a měření probíhal v termostatu při 25°C. Měření byla dvě nezávislá, každé se šesti paralelami.

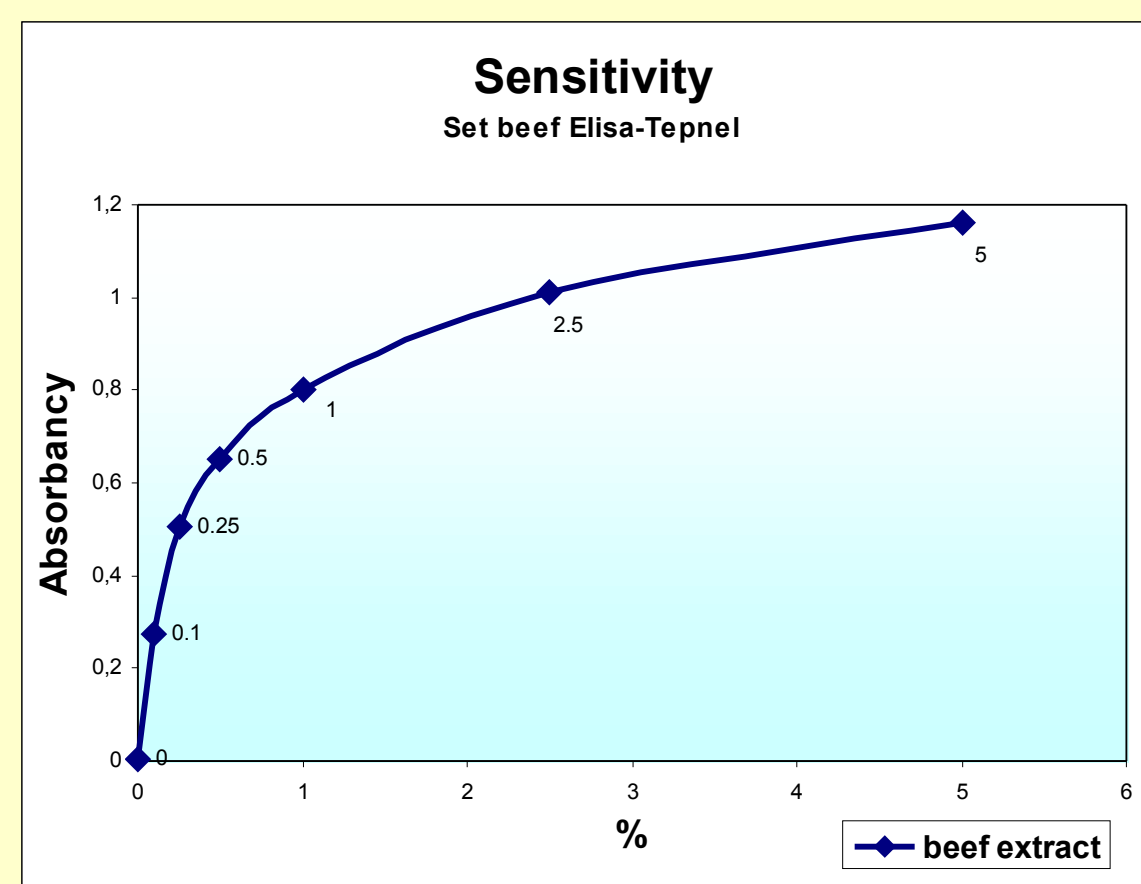
Podrobný postup imunoreakce je k dispozici u autorů.



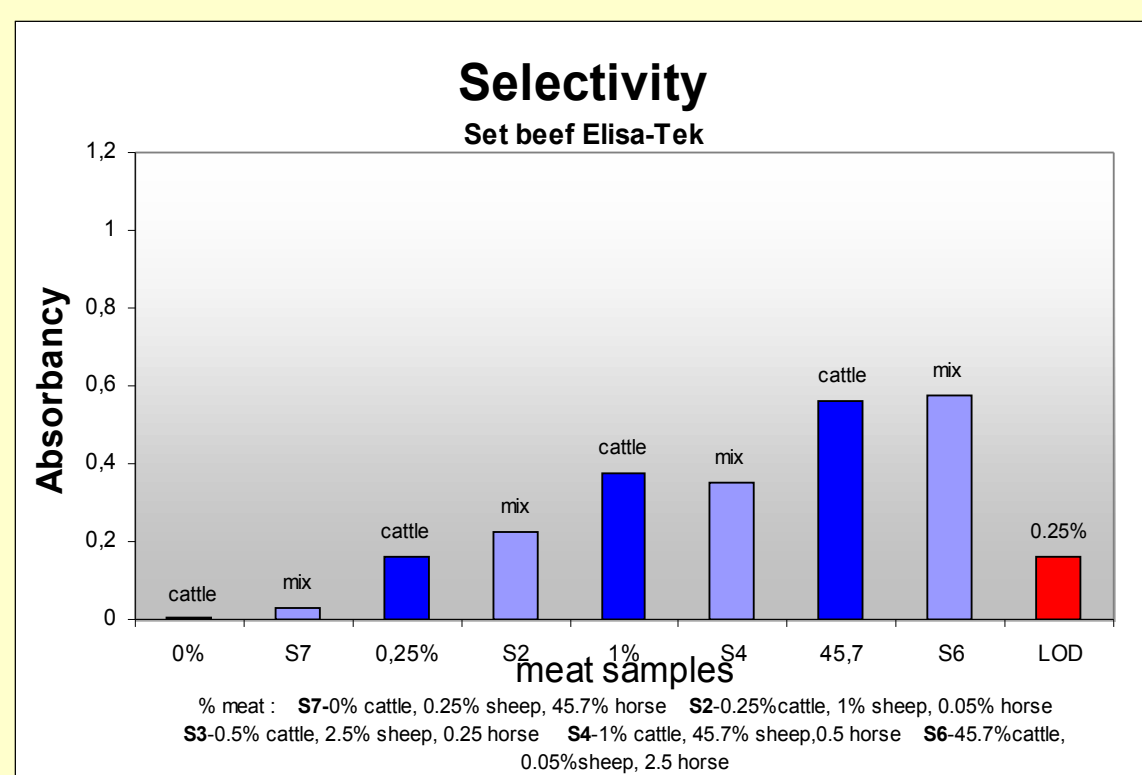
Obr. 1 Složení vzorků S1-S7



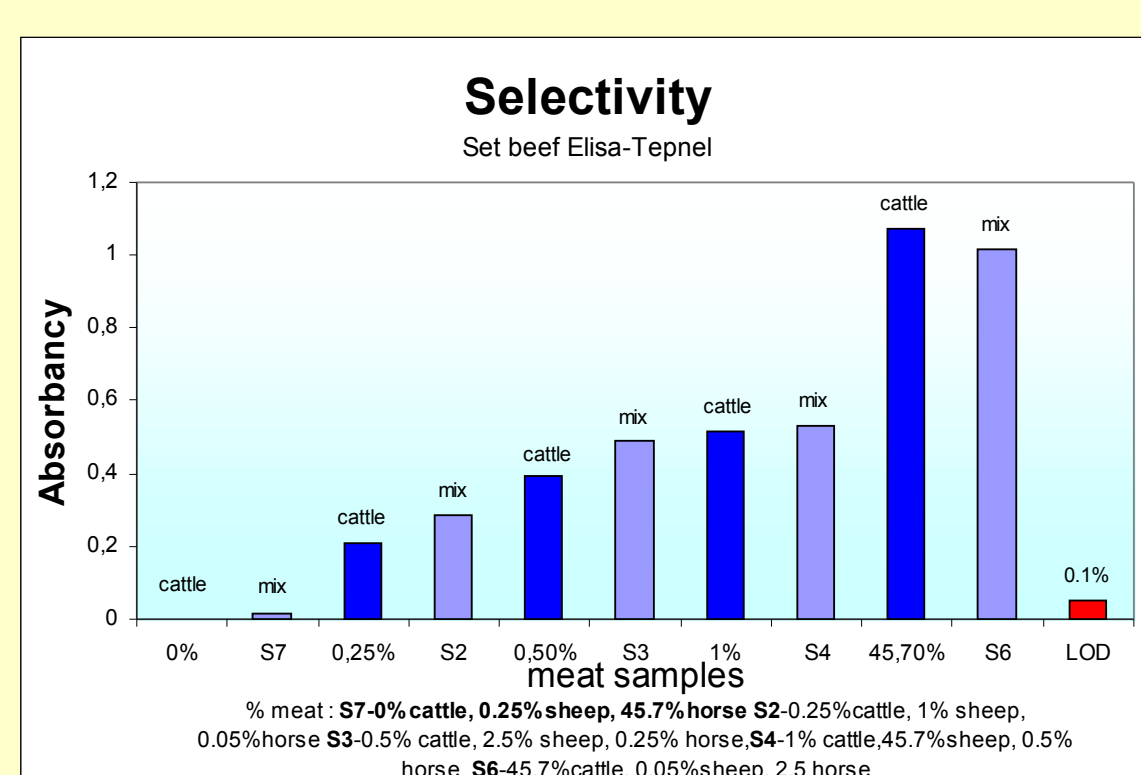
Obr. 2. Sensitivita setu ELISA Tek pro hovězí maso



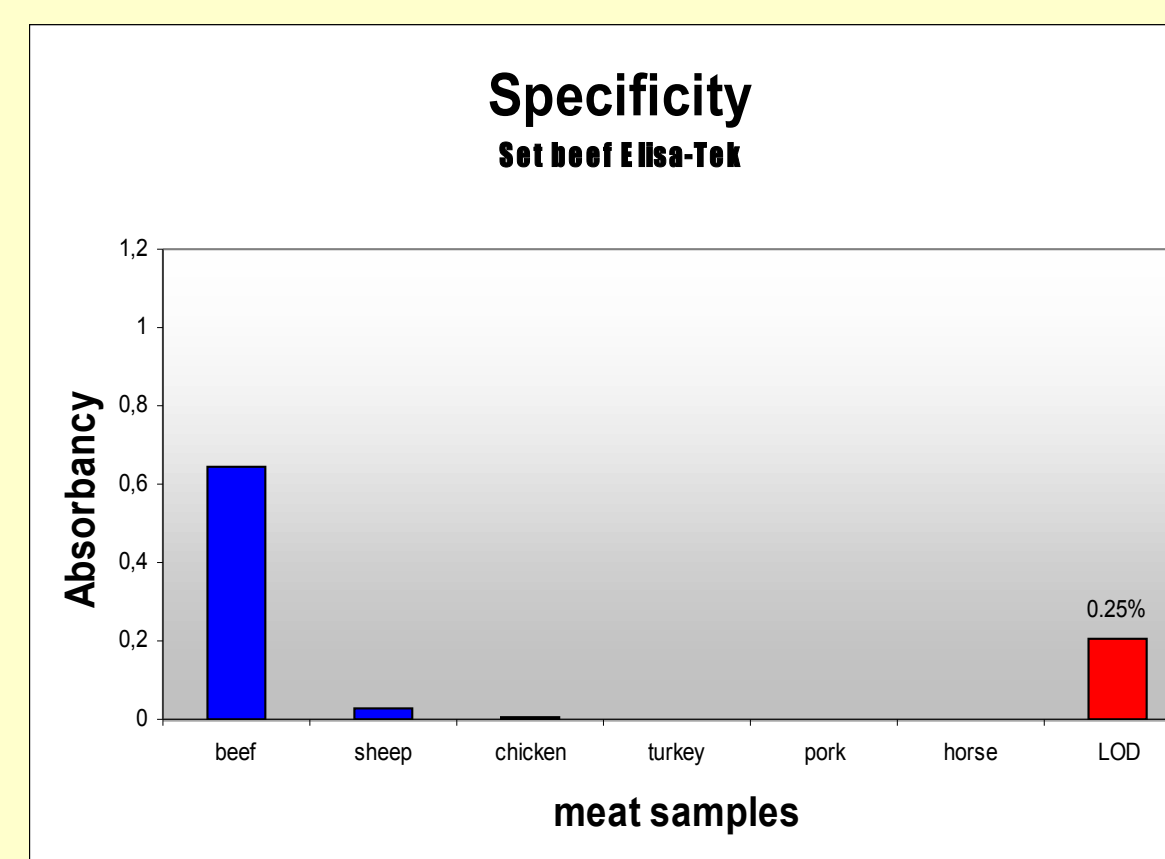
Obr. 3. Sensitivita setu ELISA Tepnel pro hovězí maso



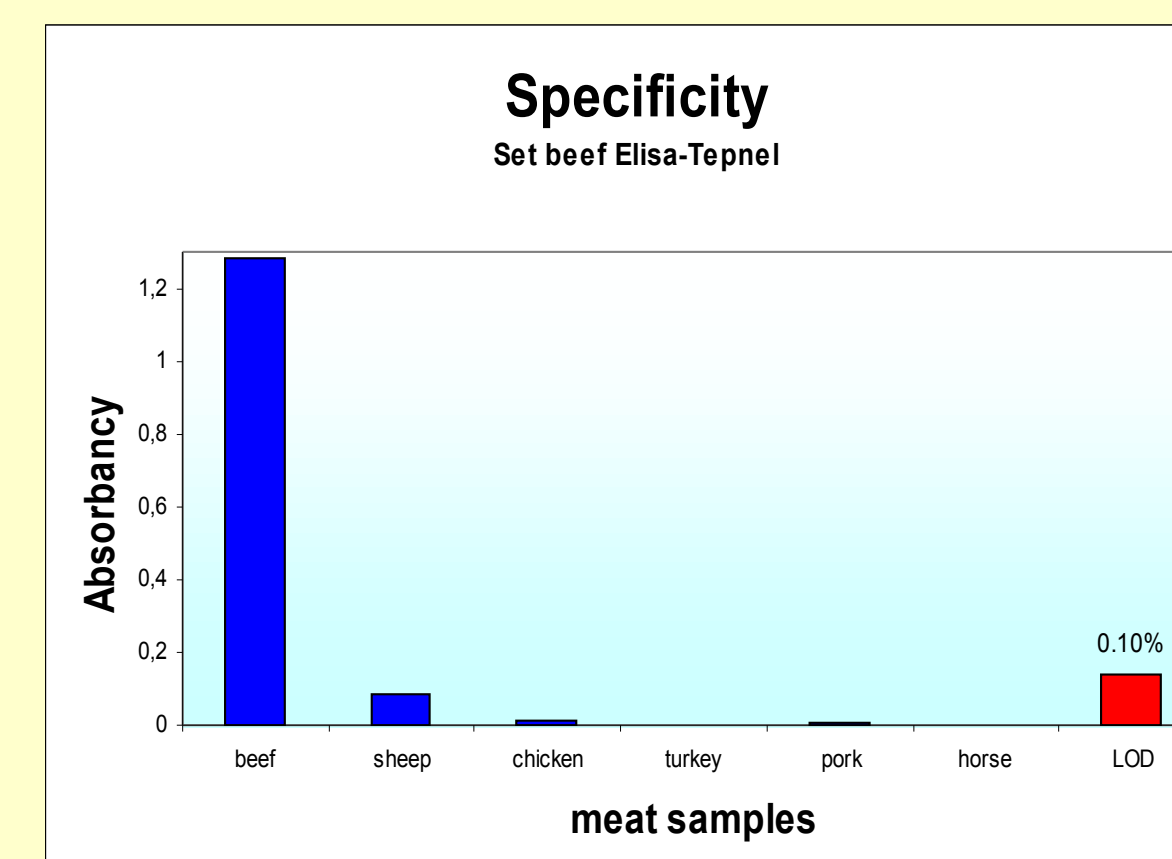
Obr. 6. Selektivita setu ELISA Tek pro hovězí maso



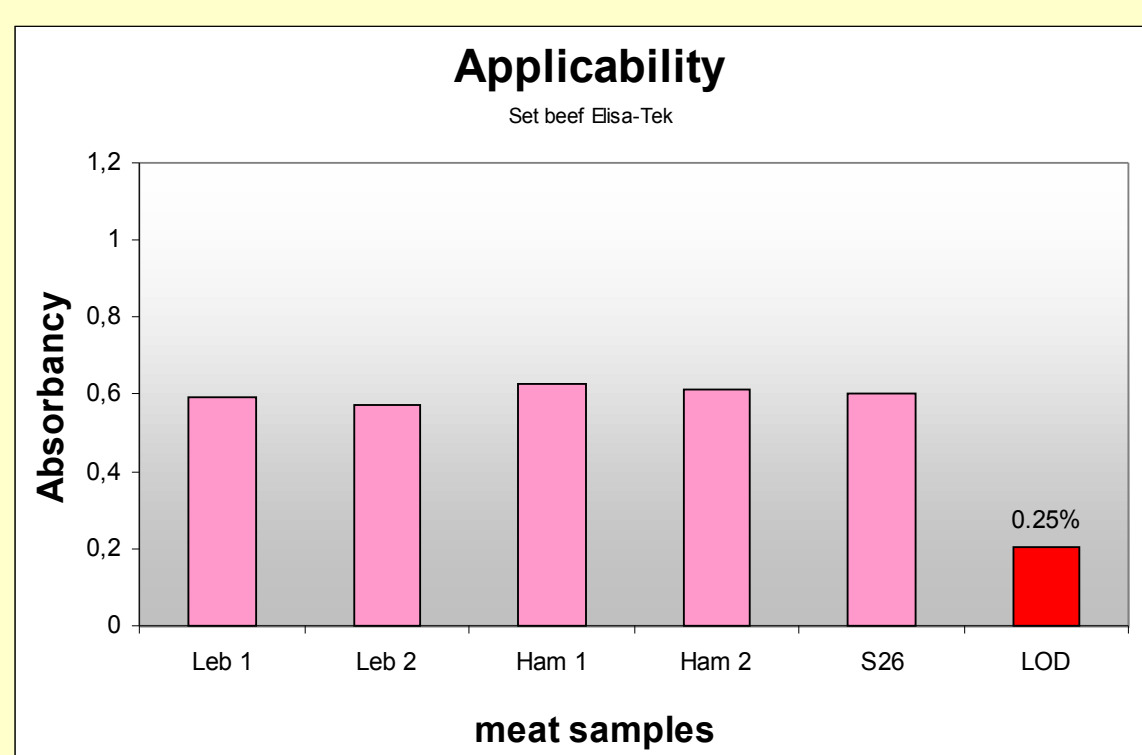
Obr. 7. Selektivita setu ELISA Tepnel pro hovězí maso



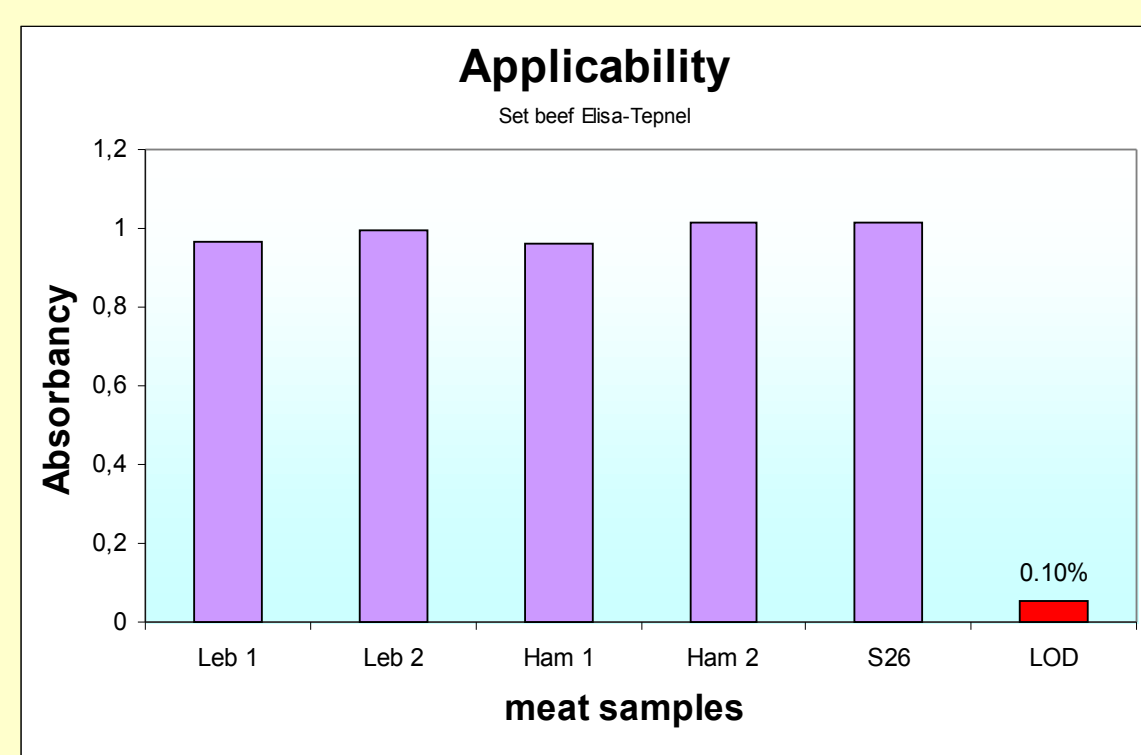
Obr. 4. Specifita setu ELISA Tek pro hovězí maso



Obr. 5. Specifita setu ELISA Tepnel pro hovězí maso



Obr. 8. Aplikovatelnost setu ELISA Tek pro hovězí maso



Obr. 9. Aplikovatelnost setu ELISA Tepnel pro hovězí maso

Složení vzorků Leb1, Leb2, Ham1, a Ham 2 je následující:

Leb 1-vepřové, hovězí, kuřecí,
Leb 2- vepřové, hovězí, krůtí
Ham 1-hovězí, vepřové, jehněčí,
Ham2- vepřové, kuřecí, koňské
S 26 - hovězí, vepřové

Závěr

- Oba sety ELISA Tek a ELISA Biosystems (Tepnel) jsou dobře použitelné pro sledování tepelně opracovaného hovězího masa.
- Je možno je použít i pro koncentrace analytu menší než 1%, vždy se standardem, který má koncentraci, odpovídající hodnotě LOD.