 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b>	Vydání	1
	50360.1 – Stanovení mykotoxinů v obilovinách metodou ELISA	Revize	1

## STANOVENÍ MYKOTOXINŮ V OBILOVINÁCH METODOU ELISA

### 1 Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení přítomnosti, případně obsahu jednotlivých mykotoxinů metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tzv. kompetitivní technikou. Postup je určen výrobcem diagnostického kitu a je nutno kontrolovat jeho platnost s každou novou šarží diagnostického kitu.

### 2 Princip

Test je založen na reakci antigenu s protilátkou. Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryty protilátkou, která je specifická k protilátce stanovovaného mykotoxinu. Přidají se protilátky proti mykotoxinu, enzymový konjugát mykotoxinu a jeho standardy nebo roztoky vzorku. Volný mykotoxin a jeho enzymový konjugát spolu soutěží o vazebná místa protilátky proti stanovovanému mykotoxinu (kompetitivní imunoenzymatická reakce). Současně jsou protilátky proti mykotoxinu vázány protilátkami, kterými jsou potaženy jamky mikrotitrační destičky. Po proběhnutí inkubace se všechen nenavázaný enzymový konjugát odstraní promytím. Do jamek se přidá substrát (chromogen) a navázaný enzymový konjugát zbarví chromogen do modra. Po následné inkubaci se přidáním stop činidla modrá barva změní ve žlutou. Absorbance se proměří fotometricky při vlnové délce 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci mykotoxinu ve vzorku.


### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie obsažené v kitu, ostatní chemikálie čistoty p. a., pokud není uvedeno jinak.

#### 3.1 Diagnostický kit pro stanovení deoxynivalonolu (DON)

3.1.1 Ridascreen FAST DON (R-Biopharm AG, Darmstadt, SRN). Kit obsahuje:

1 × mikrotitrační destičku s 96 nebo 48 jamkami (12 nebo 6 stripů, každý s 8 reakčními jamkami) s navázanou protilátkou anti-deoxynivalenolu.

	Národní referenční laboratoř <b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b> 50360.1 – Stanovení mykotoxinů v obilovinách metodou ELISA	Strana	2
		Vydání	1
		Revize	1

5 × standardní roztoky deoxynivalenolu ve vodě, každý 1,3 ml o koncentracích 0 ppm (nulový standard); 0,222 ppm; 0,666 ppm; 2 ppm; 6 ppm.

1 × konjugát (6 ml nebo 3 ml) deoxynivalenolu značený peroxidázou – červená zátka.

1 × promývací pufr pro přípravu 10mM fosfátového pufru (pH 7,4) s 0,05 % Tweenu 20.

1 × anti-deoxynivalenol protilátku (6 ml nebo 3 ml) – černá zátka.

1 × substrát/chromogen (10 ml) – hnědá zátka.

1 × stop činidlo (14ml) 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – žlutá zátka.

3.1.2 Referenční materiál s příslušným obsahem DON. Není součástí kitu.

### 3.2 Diagnostický kit pro stanovení zearalenonu (ZON)/T-2 toxinu

3.2.1 Ridascreen FAST Zearalenon/T-2 toxin (R-Biopharm AG, Darmstadt, Německo).

Kit obsahuje:

1 × mikrotitrační destičku s 48 reakčními jamkami (6 stripů s 8 jamkami) s navázanou protilátkou anti-zearalenonu/anti-T-2 toxinu.

5 × standardní roztok zearalenonu/T-2 toxinu v roztoku metanol/voda, každý 1,3 ml v koncentracích 0 ppb (nulový standard); 50 ppb; 100 ppb; 200 ppb; 400 ppb.

1 × konjugát (3 ml) zearalenon/ T-2 toxin značený peroxidázou – červená zátka.

1 × anti-zearalenon/anti-T-2 toxin monoklonální protilátka (3 ml) – černá zátka.

1 × substrát chromogen (10ml) – hnědá zátka.

1 × stop činidlo (14 ml) 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – žlutá zátka.


3.2.2 Referenční materiál s příslušným obsahem ZON/T-2 toxinu. Není součástí kitu.

### 3.3 Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

3.3.1 Destilovaná/deionizovaná voda nebo 70% metanol (podle stanovovaného mykotoxinu).

Příprava 70% metanolu: Smíchá se 70 ml metanolu a 30 ml vody.

3.3.2 Chloman sodný, NaClO, asi 2% (dekontaminační roztok).

	Národní referenční laboratoř <b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b> 50360.1 – Stanovení mykotoxinů v obilovinách metodou ELISA	Strana	3
		Vydání	1
		Revize	1

Příprava: 1 litr komerčně dodaného 11% roztoku chlornanu sodného se naředí asi 4,5 l vody.

### 3.3.3 Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 70%, (dezinfekční roztok).


Příprava: Smíchá se 70 ml etanolu a 30 ml vody.

### Poznámky

1 *Diagnostické kity se uchovávají při (2 – 8) °C.*

## 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Laboratorní šrotovník nebo jiný vhodný mlýn umožňující zpracování vzorku na šrot o velikosti částic cca (0,5 – 1,0) mm, bez přehřátí vzorku. Zařízení musí splňovat požadavek na dekontaminaci, čištění a zpracování potřebného objemu vzorku.
- 2 Vysavač.
- 3 Digestoř, ochranná obličejová polomaska, ochranné rukavice.
- 4 Váhy s přesností 0,01 g.
- 5 Dávkovač roztoků s rozsahem 50 ml a 25 ml.
- 6 Skleněné laboratorní kádinky vhodného objemu.
- 7 Hliníková fólie nebo parafilm pro zakrytí kádinek a dekontaminačních nádob.
- 8 Analytické filtrační nálevky.
- 9 Filtrační papír Whatman No.1.
- 10 Vhodné zkumavky pro záchyt extraktu.
- 11 Magnetická multimíchačka a míchadla, případně laboratorní třepačka.
- 12 Laboratorní minutky.
- 13 Stojan na nálevky.
- 14 Stojan na zkumavky.
- 15 Automatická jednonábová pipeta s nastavitelným objemem 50 µl, 100 µl.
- 16 Osmi– nebo dvanáctikanábová automatická pipeta, (50 – 250) µl.
- 17 Mikrodestičkový spektrofotometr pro 96–jamkové mikrotitrační destičky, měřící při 450 nm.
- 18 Termostat.

	Národní referenční laboratoř <b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b> 50360.1 – Stanovení mykotoxinů v obilovinách metodou ELISA	Strana	4
		Vydání	1
		Revize	1

## 5 Pracovní postup

### 5.1 Skladování vzorku

Vzorek se uchovává v suchu a temnu při laboratorní teplotě.

### 5.2 Homogenizace vzorku

Vzorek nebo jeho reprezentativní část se pomele na částice o zrnitosti cca (0,5 – 1,0) mm tak, aby nedošlo k jeho zahřívání. Při zpracování vzorku nesmí dojít k jeho kontaminaci.


### 5.3 Příprava extraktu

Do kádinky se naváží 5,00 g pomletého homogenního vzorku a přelije se daným množstvím extrakčního činidla (3.3.1). Každý vzorek se navažuje 2 ×. Pro stanovení deoxynivalenolu se vzorek extrahuje 100 ml destilované vody, pro stanovení zearalenonu/T-2 toxinu se vzorek extrahuje 25 ml 70% metanolu. Do kádinky se vloží magnetické míchadlo, kádinka se zakryje hliníkovou fólií a na magnetické míchačce se nastaví intenzivní míchání na 3 min. Pokud se použijí nádoby s těsnícím víčkem, lze třepat intenzivně na laboratorní třepačce. Po 3 min se obsah kádinky přefiltruje přes filtrační papír Whatman No. 1 do vhodné zkumavky. Po dobu, než se zpracují všechny analyzované vzorky, jsou zkumavky umístěny ve stojanu zakryté a na místě bez přímého dopadu slunečního záření.

V případě extrakce vodou se filtrát použije přímo k analýze. V případě extrakce 70% metanolem se extrakt ředí v poměru 1 : 1 destilovanou vodou. Potom se použije k analýze.

### 5.4 Obecné zásady použití diagnostického kitu

Všechny součásti kitu se před použitím vytemperují na laboratorní teplotu. Pokud se kit nepoužije najednou celý, nepoužité stripy se uschovají zpět do uzavíratelného obalu s desikantem a spolu se zbylými chemikáliemi se uskladní opět do lednice. Jamky nesmějí během analýzy vyschnout. Časy mezi jednotlivými kroky analýzy musejí být co nejkratší, doby inkubací co nejpřesnější. Pokud není v laboratoři stabilní doporučená teplota, použije se pro inkubace termostat vytemperovaný na 22 °C. Velice důležitý krok je promývání jamek pufrem nebo destilovanou vodou. Pro rovnoměrné promývání je důležité použití multikanálové pipety nebo dávkovače s rozplňovací hlavicí. Následuje rázné vyklepnutí zbytků tekutiny do čistého ručníku (složený filtrační papír na buničině apod.). Do jamek se nesmí dostat ze svého povrchu drobné částičky a je nutno zabránit doteku nebo namočení vnější strany dna jamek, protože by mohlo dojít ke zkreslení hodnot měřené absorbance. Je třeba dodržovat počet promývacích cyklů. Při analýze je třeba zabránit přístupu přímého slunečního záření.

	Národní referenční laboratoř <b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b> 50360.1 – Stanovení mykotoxinů v obilovinách metodou ELISA	Strana	5
		Vydání	1
		Revize	1

## 5.5 Postup analýzy

Do rámečku se připraví potřebný počet jamek pro všechny vzorky a standardy. Počítají se 2 jamky na každý vzorek, 2 jamky na každý bod kalibrační křivky a 2 jamky pro vkládaný referenční materiál. Kalibrační křivka se umísťuje na střed destičky (při 96-jamkové destičce je to pozice 6A až 7B, při 48-jamkové destičce je to pozice 3A až 4B). Vyplní se mapa destičky, kterou si pracovník připraví předem. Na mapě destičky jsou údaje o identifikaci vzorku a jeho pozici na mikrodestičce.

Podle připravené mapy se nanese 50 µl standardů a vzorků do jamek. Na každý vzorek i standard se použije nová špička.


Do každé jamky se přidá 50 µl konjugátu (červený uzávěr).

Do každé jamky se přidá 50 µl protilátky (černý uzávěr). Obsah jamek se na rovné ploše jemně promíchá krouživým pohybem. Pro stanovení DON se inkubuje ( $5 \pm 1$ ) min., pro stanovení ZON/T-2 toxin se inkubuje ( $10 \pm 1$ ) min; v obou případech se inkubuje při laboratorní teplotě nebo v termostatu při 22 °C.

Po inkubaci se obsah jamek rázně vyklepne do výlevky a zbytky tekutiny se odstraní opatrným klepnutím destičky několikrát do čistého ručníku (složený filtrační papír na buničině apod.). Pomocí osmikanálové pipety (multistepperu) se všechny jamky promyjí rovnoměrně buď vodou, nebo promývacím roztokem dle návodu výrobce (250 µl/jamku). Promývání se opakuje ještě 2 × (DON), resp. 4 × (ZON/T-2 toxin).

Do každé jamky se přidá 100 µl substrátu – chromogenu (hnědý uzávěr), jemně se promíchá krouživým pohybem. Pro stanovení DON se nechá se inkubovat ( $3 \pm 0,5$ ) min, pro stanovení ZON/T-2 toxin ( $5 \pm 0,5$ ) min; v obou případech se inkubuje ve tmě při laboratorní teplotě (20 – 25) °C nebo v termostatu při 22 °C.

Do každé jamky se přidá 100 µl stop činidla – kyseliny sírové (žlutý uzávěr). Jemně se promíchá a změří se absorbance při 450 nm. Po 5 min se absorbance změří znovu. Reakce se musí změřit do 10 min od přidání stop činidla.

	Národní referenční laboratoř <b>Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd</b> 50360.1 – Stanovení mykotoxinů v obilovinách metodou ELISA	Strana	6
		Vydání	1
		Revize	1

## 6 Hodnocení testu

Kvantitativně se test hodnotí pomocí kalibrační křivky. Dle výrobce diagnostického kitu jsou možné dva přístupy hodnocení testu:

1. Průměrné hodnoty naměřených absorbancí standardů ( $A_s$ ) a vzorků ( $A_v$ ) se dělí hodnotou absorbance nulového standardu ( $A_0$ ) a násobí  $100 \times$ . Nulový standard má tak hodnotu odpovídající 100 % a hodnoty ostatních absorbancí se vyjádří v procentech  $[A_s (A_v) / A_0] \times 100 = \% \text{ absorbance}$ . Hodnoty vypočtené pro standardy se vynesou proti hodnotám koncentrací standardů stanovovaného mykotoxinu. Koncentrace odpovídající jednotlivým vzorkům se odečtou z kalibrační křivky.
2. Pro standardy i vzorky se vypočte hodnota IA podle:  $IA = \log [A/(A_0-A)]$ , kde A je naměřená absorbance a  $A_0$  je absorbance nulového standardu. Na osu x se vynesou koncentrace a na osu y hodnoty IA. Koncentrace odpovídající jednotlivým vzorkům se odečtou z kalibrační křivky.

## Poznámky

- 2 *Případné nečistoty v jamce – prach, bubliny nebo nečistoty na spodní straně dna jamky mohou způsobit falešně pozitivní výsledky. Je-li jamka kontaminovaná, nelze výsledek použít, v ostatních případech se problém odstraní a provede nové měření.*
- 3 *Rozdílné absorbance paralelních jamek mohou být způsobeny vlhkostí spodní strany destičky nebo špatným promícháním obsahu jamek. Dno destičky je třeba opatrně zespodu otřít do suché, čisté látky a destičkou opatrně zakroužit a znovu změřit.*
- 4 *Je naprosto nezbytné vypracovat přesnou mapu každé destičky a během analýzy dbát, aby nedošlo k záměně vzorků.*

## 7 Literatura

- 1 Návod pro použití kitu: RIDASCREEN FAST DON, RIDASCREEN FAST T-2 TOXIN, RIDASCREEN FAST ZEARALENON, R-Biopharm AG, Darmstadt, Německo, 2017.