

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

1 Popis vzorku

Podle tohoto postupu se vyšetřují vzorky různých druhů masných výrobků, ale také strojně odděleného masa.

Pomocí histochemického barvení lze prokázat přítomnost kostních úlomků a na jejich základě vyslovit podezření o použití strojně odděleného masa jako výrobní suroviny v masném výrobku.

2 Detekční limit vyšetření

Detekční limit není nutné stanovit v objemových procentech, protože se jedná o příměs, která se v masných výrobcích nachází ojediněle. Běžným nálezem je jen v případě použití strojně odděleného masa, jehož součástí jsou úlomky kostí. Za průkaz použití strojně odděleného masa se považuje nález 3 kostních úlomků na 10 histologických řezech.

3 Časová náročnost

příprava vzorků
24 hod.

vlastní pracovní postup
41 min.

4 Zpracování vzorku

4.1 Množství vzorku

Vzorky se odebírají v dostatečném množství, tak aby bylo možno provést požadovaná vyšetření.

Odebírá se:

strojně oddělené maso

nejméně 50 g

masný výrobek

balení z tržní sítě

4.2 Odběr vzorků

Odběr vzorků SOM se provádí přímo v závodech, kde se strojně oddělené maso získává na výrobních zařízeních různého typu. Mohou se zpracovávat také vzorky dodané výrobcem chlazené nebo zmražené.

Masné výrobky se odebírají v tržní síti, kde jsou nabízeny spotřebiteli.

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

4.3 Vlastní zpracování vzorků

Vzorky se co nejdříve po odebrání fixují v 10% roztoku neutrálního formolu, nejlépe přímo na místě odběru. Zmrazené vzorky se zpracovávají po rozmrazení.

Zásady při fixaci:

- odebraný vzorek musíme vložit do fixační tekutiny co nejdříve po odběru
- vzorek se dává do fixační tekutiny ve speciálních krabičkách nebo zabalený do gázy, kdy průměr vzorku, by neměl být větší než 1 cm
- množství fixační tekutiny musí alespoň 20x až 50x převyšovat objem fixovaného vzorku,
- tekutina musí mít ze všech stran přístup ke vzorku, proto vzorek podkládáme např. vatou nebo filtračním papírem.

5 Metoda

5.1 Chemikálie a roztoky:

- alkohol
- methylosalicylát
- alizarinová červen S
- formol
- indigokarmín
- kyselina octová
- kyselina pikrová
- Parafin – parafín s včelím voskem
- pufrý: pH 4 ftalátový, pH 7 fosfátový
- hydroxid sodný
- xylen čistý
- xylen p. a.

5.2 Přístroje a zařízení

(používané přesně dle pracovního návodu dodaného s přístrojem)

- autotechnikon)
- mikrotom sáňkový/rotační
- digestoř
- speciální barvicí kyvety nebo barvicí automat
- destilační přístroj
- váhy
- pH metr

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

- topné hnízdo (LTHS 1000, bez porušené sítě)
- termostat

5.3 Laboratorní pomůcky

- gáza
- pinzety
- skalpel
- nůž
- podložka na krájení
- zalévací komůrky
- popisovací tužky
- teploměry
- vata
- vatové tampóny
- filtrační papír

5.4 Laboratorní sklo (kalibrované)

- pipety
- kádinky 200 ml
- podložní a krycí skla
- nálevky

6 Vlastní pracovní postup

6.1 Příprava parafínových řezů

Tento postup zahrnuje:

- fixaci vzorku v 10% formalínu minimálně 24 h
- odvodnění vzorků

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

a/ ručně

vypírání formalínu vodou	30 min
alkohol	20%.....	30 min
	40%.....	60 min
	50%.....	60 min
	70%.....	120 min
	80%.....	přes noc
	96%.....	60 min
	100%.....	120 min
methylosalicylát I	60 min
methylosalicylát II	60 min
methylosalicylát III	přes noc
xylén I	15 min
xylén II	15 min
xylén III	15 min
parafin I (čistý)	120 min
parafin II (p. a.)	120 min
parafin III (p. a.)	přes noc
zalití	4. den

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

b/ v autotechnikonu

vypírání formalínu vodou	30 min
alkohol	50%.....	40 min
	70%.....	20 min
	96%.....	60 min
	96%.....	100 min
	96%.....	60 min
	100%.....	60 min
	100%.....	60 min
aceton	20 min
xylén I (čistý)	20 min
xylén II (p. a.)	20 min
parafin I	180 min
parafin II	12 hod
zalití	

6.2 Zalévání

K zalévání použijeme komerčně připravené zalévací medium Parafin, jehož základem je parafin upravený včelím voskem. Jedná se o medium nerozpustné ve vodě. Vzorek prosycený parafínem, se zalévá v zalévacích komůrkách na zalévací lince a po zchlazení získáme bloček připravený ke krájení.

Pro každý vzorek připravíme 4 bločky.

6.3 Krájení bloček

Krájení vzorků pro cílená barvení se provádí podle uvedeného schématu.

Schéma krájení řezů (4 bloky - A, B, C, D)

blok A

1. řez – asi 50 µm odkrojit – **2. řez** – asi 50 µm odkrojit – **3. řez** - asi 50 µm odkrojit – **4. řez** – asi 50 µm odkrojit – **5. řez** - asi 50 µm odkrojit – **6. řez**

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

blok B

7. řez – asi 50 µm odkrojit – **8. řez** – asi 50 µm odkrojit – **9. řez** - asi 50 µm odkrojit – **10. řez** – asi 50 µm odkrojit – **11. řez** - asi 50 µm odkrojit – **12. řez**

blok C

13. řez – asi 50 µm odkrojit – **14. řez** – asi 50 µm odkrojit – **15. řez** - asi 50 µm odkrojit – **16. řez** – asi 50 µm odkrojit – **17. řez** - asi 50 µm odkrojit – **18. řez**

blok D

19. řez – asi 50 µm odkrojit – **20. řez** – asi 50 µm odkrojit – **21. řez** - asi 50 µm odkrojit – **22. řez** – asi 50 µm odkrojit – **23. řez** - asi 50 µm odkrojit – **24. řez**

Tkáně zalité v parafínu se krájí na sáňkovém nebo rotačním mikrotomu. Základní součásti uvedeného typu mikrotomu jsou: podstavec, nůž, zařízení na upevnění bloku a zařízení na posun bloku proti noži. Tloušťka řezů se nastaví 4 µm.

6.4 Barvení preparátů – přehledné a cílené barvicí postupy

Řezy je nutné před barvením zbavit parafínu. Parafín se v řezech rozpouští rozpouštědlem (xylen) a přes etanol se řezy převedou do vody, protože histologická barviva jsou převážně rozpustná ve vodě. Barví se ručně ve speciálních kyvetách nebo v barvicím automatu. Barviva a směsi barviv se aplikují dle popsání postupu.

Alizarinová červeň

Cíl: zvýraznění kostní tkáně

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

Postup:

odparafinování	xylén.....	10 min
	100 % alkohol + éter (2/3+1/3).....	10 min
1% kyselina octová.....		oplach
destilovaná voda.....		oplach
roztok kyselina pikrová – alizarin.....		5 minut
destilovaná voda.....		oplach
indigokarmín.....		3 min
destilovaná voda.....		oplach
odvodnění (alkohol)	96%.....	oplach
	100%.....	oplach
xylén I (čistý)	5 min
xylén II (p. a.)	5 min

Příprava roztoků:

Kyselina pikrová – alizarin:

0,5 g	alizarinová červeň S
50 ml	destilované vody
50 ml	1,2 % kyseliny pikrové

- alizarin rozpustit v destilované vodě, přidat kyselinu pikrovou a zamíchat. Pomocí NaOH upravit pH na 4,3 – 4,5. Přefiltrovat, přidat thymol (konzervace).

Indigokarmín:

0,2 g	indigokarmínu
80 ml	destilované vody

Výsledek:

kost	– žlutočerveně
vazivo	- modře

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

6.5 Uzavírání obarvených řezů

Správně nabarvený preparát se uzavírá mezi podložní a krycí sklo do vhodného montovacího média. Obvykle jsou to látky nerozpustné ve vodě, a proto je nutno řezy provést alkoholovou řadou (odvodnit) a převést do rozpouštědla (xylynu). K montování řezů použijeme montovací medium - syntetickou pryskyřici rozpustnou v xylynu.

Postup při montování:

Kapka média se umístí na okraji řezu, krycí sklíčko se přiloží v úhlu 45° a opatrně se spouští, důležité je, aby nevznikly bubliny. Preparát se nechá zaschnout a potom se opatrně očistí okraje.

7 Vyšetření preparátů a hodnocení výsledků

Obarvené řezy jsou vyšetřovány ve světelném mikroskopu při menším zvětšení (např. 32 x nebo 40 x), pro studium detailů je používáno většího zvětšení. Obvykle se jedná o kvalitativní vyšetření. Popisuje se přítomnost jednotlivých druhů tkání ve vyšetřovaných vzorcích. Jemožné se zaměřit jen na průkaz vybraných druhů tkání zvýrazněných speciálním barvicím postupem. Při identifikaci tkání živočišného i rostlinného původu je nutné vycházet z údajů v literatuře, pro srovnávání používat vzorky, připravené v laboratoři a dále také schématické obrázky a fotodokumentaci z literatury.

8 Dokumentace

O každém vyšetřovaném vzorku je veden laboratorní protokol s těmito údaji - datum odběru, druh výrobku, výrobce, složení (pokud bylo známé), postup zpracování (fixace, barvení), výsledek vyšetření. Aby nedošlo k záměně vzorků, je třeba označit nádobku názvem vzorku a číslem, pod kterým je vzorek veden v laboratorním protokolu, příp. i datem odběru, a dále i druh použité fixační tekutiny. Stejným způsobem označíme bločky a mikroskopická skla. Na skla s preparátem se označí také zkratka použitého barvení (alizarinová červeň - AČ). Všechny zhotovené preparáty jsou uchovány, podle potřeby je zhotovena fotodokumentace.

9 Výsledek

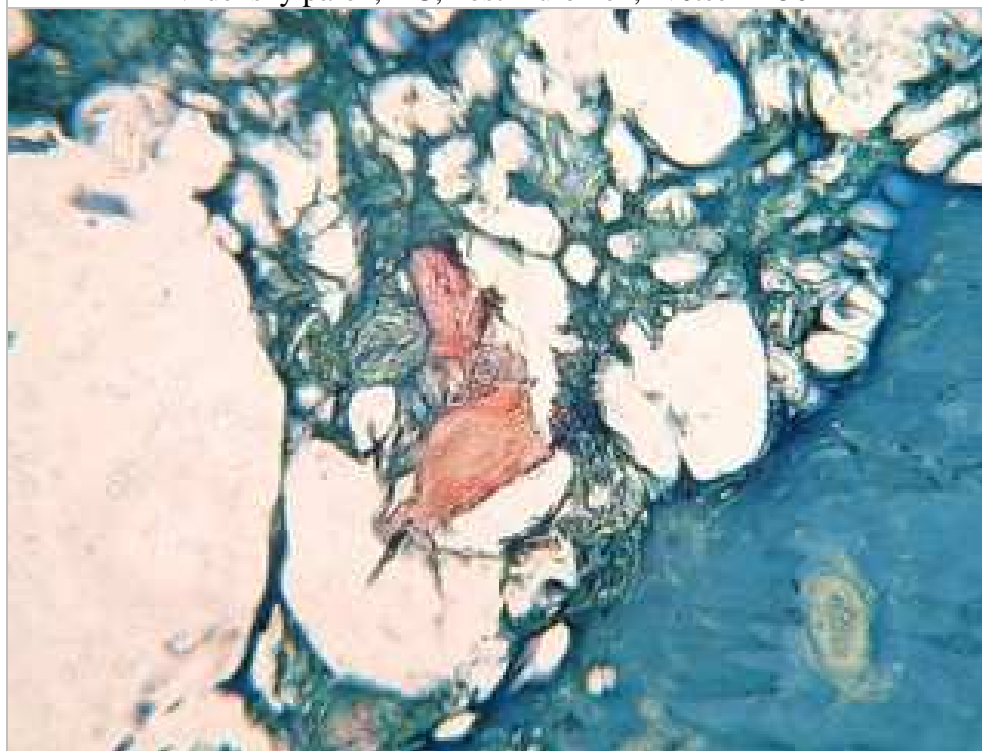
Kostní úlomky jsou barveny červeně.

Protokol 01	
Sledovaná složka potraviny	Kostní úlomky
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

10 Fotodokumentace



Vídenský párek, AČ, kostní úlomek, zvětšení 250x



Kabanos, AČ, kostní úlomek, zvětšení 250x

Protokol 01	
Sledovaná složka potravin	Kostní úlomky
Druh potravin	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Histochemicky, stanovení alizarinovou červení
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

11 Seznam použitých zkratk

AČ - alizarinová červeň