

НАБОР ИФА
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИГЕНА 0157 ИНФЕКЦИИ ESCHERICHIA
COLI В ОБРАЗЦАХ СТУЛА

8302-3, E.Coli 0157

Каталог. № : 8302-3
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 24-06-2008



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ELISA набор компании DAI для определения антигена *E.coli* 0157 – процедура *in vitro* для качественного определения антигена *Escherichia coli* 0157 в образцах стула. Анализ разработан как скрининговое средство для быстрого предполагаемого определения наличия бактерии *E. coli* 0157 без предварительной обработки образца стула. Затем для подтверждения наличия 0157 и его антигена H типа положительные образцы в иммуноферментном анализе (ELISA) должны культивироваться и распределяться на серотипы.

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Данный анализ – твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), основанный на принципе двойного антитела («сандвича»), использует антитело анти-*E. coli* 0157, чтобы захватить антиген из супернатанта стула. Затем добавляется второе антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена, которое связывается с комплексом. Эта реакция визуализируется после добавления хромогена тетраметилбензидина (ТМВ). Образовавшийся синий цвет указывает на наличие антигенов *E.coli* 0157, связанных антителами анти-*E. coli* 0157.

РЕАГЕНТЫ

Позиция	Описание
Полоски для анализа	Микролунки, содержащие поликлональные антитела анти- <i>E. coli</i> 0157 - 96 лунок в рамке для полосок.
Ферментный конъюгат	1 бутылка с 11 мл козлиного поликлонального антитела анти- <i>E. coli</i> 0157, конъюгированного с пероксидазой с красным красителем и тимеросалом.
Положительный контроль	1 флакон с 2 мл клеток <i>E. coli</i> 0157 в буферной основе.
Отрицательный контроль	1 флакон с 2 мл буфера для разбавления.
Хромоген	1 бутылка с 11 мл хромогена тетраметилбензидина (ТМВ) и перекиси.
Промывочный концентрат (20x)	2 бутылки с 25 мл концентрированного буфера и поверхностно-активного вещества с тимеросалом.
Стоп раствор	1 бутылка с 11 мл 1М фосфорной кислоты.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

ELISA набор для определения антигена *E. coli* 0157.

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Пипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок.
- Дистиллированная вода.
- Мерная колба.

Рекомендуемое оборудование

ELISA спектрофотометр для считывания планшетов с фильтром 450/620-650 нм.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не используйте растворы, если они выпадают в осадок или становятся мутными.

Исключение: Промывочный концентрат может выпадать в осадок во время хранения в холодильнике, но растворяется после нагревания.

Не добавлять в образцы или в любые реагенты азиды.

Контроли и некоторые реагенты содержат тимеросал в качестве консерванта.

Обращайтесь со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами. Предотвращайте образование, аэрозоль и обеззараживайте любые брызги образцов.

Не смешивайте компоненты разных партий наборов.

При использовании образцов обработанных формалином, также необходимо собрать свежие образцы, таким образом проводя культивирование с реактивным образцом для анализа.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, полоски и компоненты в бутылках: Хранить при 2-8°C.

Гибкая бутылка с разбавленным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре. Разбавленный промывочный буфер следует использовать в течении года.

ПОДГОТОВКА

Промывочный буфер - снимите колпачок и добавьте содержимое 1 бутылки промывочного концентрата 20x в гибкую бутылку с 475 мл дистиллированной воды. Перемешать. Уровень pH должен находиться в диапазоне 7,0 – 7,4. Для оптимизации промывок гибкая бутылка должна иметь узкий наконечник.

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

Хотя большая часть (приблизительно 90 %) инфекций *E. coli* 0157 связана по крайней мере с одним случаем кровавого поноса, любой аномальный образец может содержать *E. coli* 0157.

Так как организм может быть сброшен только несколько дней (исследования показали, что уровень обнаруживаемых организмов культуры значительно падает после 6 дня), образец должен быть собран как можно скорее. Клиническому сотруднику рекомендуется сверяться с государственным отделом здравоохранения или центрами предотвращения и контроля болезней, чтобы определить, которые образцы необходимо проверить и заслуживают ли результаты внимания.

Сбор стула (кала)

Могут использоваться свежие и замороженные образцы стула или хранящиеся в среде Кери Блэр или консервующей среде 10% буферизованного формалина. Формалиновые образцы необходимо собирать согласно инструкций производителя (приблизительно разбавление в емкости 1:4).

Образцы, не обработанные консервантом должны храниться при 2 - 8°C и анализироваться в пределах 24 часов с момента сбора. Образцы, которые не анализируются в пределах этого времени должны заморозиться до использования при -20°C или ниже.

Образцы в среде Кери Блэр необходимо раз заморозить перед использованием. Эта процедура разорвет матрикс агара и освободит антиген.

Все разбавления необработанных консервантом образцов стула должны быть проведены с промывочным буфером

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Свежие/замороженные образцы стула

Разморозьте образец. Приготовьте суспензию стула путем добавления приблиз. 1 грамма стула в 3 мл буфера. Хорошо перемешайте и позвольте осесть тяжелым частицам. Проведите аналогичное разбавление образца, несмотря на его консистенцию.

Перенос образцов стула Кери Блэр

Заморозьте или аликвотируйте образец. Разморозьте и проведите разбавление как и со свежими/замороженными образцами стула (см. выше).

Образцы стула обработанные формалином

Не требуется никакой дальнейшей подготовки образца. Однако, помните, что невозможно подтвердить результат культивирования образцов, обработанных формалином.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Все процедуры проводятся при комнатной температуре (от 15 до 25°C).

1. Отломить требуемое количество лунок (две для контролей и определенного количества образцов) и положить в рамку для полосок.
2. Добавить 100 мкл отрицательного контроля в лунку #1, 100 мкл положительного контроля в лунку #2 (используйте неразбавленными оба контроля).
3. Добавить 100 мкл супернатанта стула в соответствующую лунку для анализа.
4. Инкубировать в течении 30 минут, затем промыть*.
5. Добавить в каждую лунку по 2 ферментного конъюгата (красный раствор).

6. Инкубировать в течении 30 минут, затем промыть 3 раза дистиллированной водой.
7. Добавить в каждую лунку по 2 капли хромогена.
8. Инкубировать в течении 10 минут.
9. Добавить в каждую лунку по 2 капли стоп раствора. Перемешайте содержимое лунок, осторожно постукивая по рамке для полосок указательным пальцем.
10. Визуально считать результаты или на спектрофотометре при 450 нм и 620-650 нм в течении 1 часа. В рабочем состоянии установить считыватель на нуль.

*Каждая промывка состоит из использования разбавленного промывочного буфера для заполнения до края каждой лунки, вытряхивая содержимое и обратного заполнения лунки в общем количестве 3-5 раз. Образцы стула с липкими и/или слизистыми частицами могут потребовать более тщательной промывки чем другие образцы стула. Если стул не вымыт тщательно из лунки перед добавлением последующих реагентов, существует вероятность ошибочно положительных результатов. Только 1 набор контролей должен быть включен во время каждой процедуры.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ - визуальная:

Реактивный: Любая лунка с образцом, которая явно и отчетливо желтая. Легкий оттенок желтого цвета в лунке недостаточен чтобы назвать образец реактивным.

Нереактивный: Любая лунка с образцом, которая не имеет значительного и явного желтого цвета.

ЗАМЕЧАНИЕ: Отрицательный контроль, также как и некоторые образцы, может показывать некоторый слабый цвет. Чтобы результат назвать положительным лунка образца должна быть явно темнее чем лунка отрицательного контроля. При необходимости обратитесь к листу визуальной интерпретации.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ – считывания ОП:

Реактивный: считывания ОП 0.15 единиц и выше.

Нереактивный: считывания ОП меньше чем 0.15.

Сомнительная Зона: считывания ОП в диапазоне от 0.15 до 0.30. Образцы со считыванием в этом диапазоне должны анализироваться повторно. Попеременно, можно взять второй образец или использовать другую методику (такую как разведение культуры).

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны использоваться как вспомогательное средство в диагностике и не должны интерпретироваться как сам диагноз. Этот анализ разработан для быстрого предполагаемого скрининга на присутствие *E. coli* 0157 независимо от выработки H (жгутикового антигена) или веротоксина.

Отрицательный результат может быть получен при уровне антигена ниже чем пределы определения анализа. Исследования высева показали, что данный анализ имеет минимальное количество организмов (MOI) на уровне от 3,000 до 11,000 CFU/ml в зависимости от существующего штамма *E. coli* 0157.

Люди, инфицированные этим организмом, могут сбрасывать только этот обнаруживаемый уровень в первых 3-6 дней после проявления симптомов. Положительный результат в этом ELISA анализе указывает, что в образце был обнаружен антиген 0157 LPS. Этот LPS антиген обнаруживается на организмах *E. coli* 0157 независимо от состояния их H антигена и выработки веротоксина. Этот LPS антиген также обнаруживается на *Salmonella urbana* (030). Таким образом, положительный образец в этом ELISA анализе должен культивироваться и разделен на серотипы, чтобы определить точный род, разновидность и существующий серотип. Анализ клетки веротоксина с использованием изолята помогает определить выработку организмом веротоксина.

Хотя фактические образцы стула не показали никакой потери реактивности во время хранения при -20°C в течении 2 лет, результат длительного хранения может потенциально воздействовать на анализ.

Эффективность этого анализа с использованием обработанных формалином образцов не была полностью исследована.

Положительный контроль не срабатывает, если стабильность набора поставлена под угрозу.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Нормальные здоровые люди не должны иметь *E. coli* 0157 и должны показывать отрицательные результаты. Положительная реакция указывает, что пациент сбрасывает обнаруживаемые количества антигена *E. coli* 0157. Это сбрасывание антигена может происходить только в течении нескольких дней (как правило 3-6 дней) после проявления симптомов.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Положительный и отрицательный контроли должны использоваться при каждом проведении анализа. Положительный контроль, включенный в набор – контроль высокой реактивности. Лаборатория может также хотеть включить внутренний положительный контроль, который ближе к значению исключения.

При действительной процедуре отрицательный контроль должен быть в пределах диапазона от 0.00 до 0.14 единицы ОП и положительный контроль более чем 1.0 единицы ОП. Если любой контроль находится вне диапазона, не используйте набор.

Использование положительного и отрицательного контроля позволяет облегчить проверку стабильности набора. При действительном анализе положительный контроль должен иметь меру поглощения света по крайней мере 0.5 единицы ОП и отрицательный контроль должен быть меньше чем 0.15 единицы ОП. При падении значения ниже этого предела, набор не должен использоваться.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследование #1 – против SMAC

K-во = 174

		Микроскопия	
		+	-
DAI	+	11	0
	-	1	162

Чувствительность: 11/12 = 92%

Специфичность: 162/162 = 100%

ОБНАРУЖЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема: Отрицательный контроль значительно развил цвет.

Исправление: Несоответствующие промывки. Повторить анализ с более тщательными промывками.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com