

НАБОР ИФА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОТОКСИНА E. COLI В ОБРАЗЦАХ СТУЛА

8303-3, E.Coli Verotoxin

Каталог. № : 8303-3 Методика от 24-06-2008
Количество : 96
Производитель: DAI (США)



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 веротоксина *E.coli* – процедура *in vitro* для качественного определения веротоксина в образцах стула. Данный анализ – твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), основанный на принципе двойного антитела («сэндвича»), использует антитела анти-веротоксина, чтобы захватить антиген из супернатанта стула. Затем добавляется смесь из второго моноклонального антитела анти-веротоксина, которое связывается с комплексом. Эта реакция визуализируется после добавления анти-мышинных антител, конъюгированных с пероксидазой. Образовавшийся после добавления хромогена синий цвет указывает на наличие веротоксина, связанного антителами анти-веротоксина.

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

В течение первой инкубации веротоксин, присутствующий в супернатанте стула, захватывается антителами, закрепленными на лунках. При второй инкубации дополнительно вносится смесь антител анти-веротоксина, которая «наслаивается» на антиген. Во время следующей инкубации пероксидаза хрена присоединяется к слою материала. После промывок для удаления несвязанного фермента добавляется хромоген, который развивает синий цвет в присутствии комплекса фермента и перекиси. Стоп раствор останавливает реакцию и превращает синий цвет в желтый.

РЕАГЕНТЫ

Позиция	Описание
Полоски для анализа	Микролунки, покрытые кроличьими антителами анти-веротоксина (VT1и VT2)- 96 лунок в рамке для полосок.
Реагент 1	1 бутылка с 11 мл моноклональных антител анти-веротоксина в буфере с тимеросалом.
Реагент 2	1 бутылка с 11 мл анти-мышинного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена в буфере с тимеросалом.
Положительный контроль	1 флакон с 2 мл положительного антигена веротоксина в буфере.
Отрицательный контроль	1 флакон с 2 мл буфера.
Хромоген	1 бутылка с 11 мл тетраметилбензидина (ТМВ) и перекиси.
Промывочный концентрат (20х)	2 бутылки с 25 мл концентрированного буфера и поверхностно-активного вещества с тимеросалом.
Стоп раствор	1 бутылка с 11 мл 1М фосфорной кислоты.

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.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, полоски и компоненты в бутылках: Хранить при 2-8°C. Гибкая бутылка с разбавленным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре.

ПОДГОТОВКА

Промывочный буфер/буфер для разбавления

Снимите колпачок и добавьте содержимое 1 бутылки промывочного концентрата к 475 мл дистиллированной воды. Перенесите содержимое разбавленного промывочного буфера в гибкую бутылку (с небольшим наконечником).

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

Сбор стула (кала)

Стул необходимо собрать в чистые емкости.

Образцы должны храниться при 4°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. Замораживание образцов не воздействует неблагоприятно на анализ, однако, избегайте повторных замораживаний/размораживаний.

Все разбавления должны быть сделаны разбавленным промывочным буфером.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Свежие/замороженные образцы стула

Разморозьте замороженные образцы стула. Приготовьте разбавление стула 1:4 путем добавления 1 грамма (приблизительно размером с горошину) к 3 мл разбавленного промывочного буфера. Хорошо перемешайте и позвольте осесть тяжелым частицам.

Для образцов стула с диареей может использоваться более низкое разбавление (то есть, разбавление 1:2).

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

ELISA набор для определения веротоксина *E. coli*.

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.

ПРОЦЕДУРА

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 оба как неразбавленные).
3. Добавить 100 мкл супернатанта стула в соответствующую лунку для анализа.
4. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут, затем промыть*.
5. Добавить в каждую лунку по 2 капли реагента 1 (синий раствор).
6. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
7. Добавить в каждую лунку по 2 капли реагента 2 (красный раствор).
8. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
9. Добавить в каждую лунку по 2 капли хромогена.
10. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10 минут.
11. Добавить в каждую лунку по 2 капли стоп раствора. Хорошо перемешать, постукивая по рамке для полосок.
12. Визуально считать результаты или на спектрофотометре, используя бихроматическое считывание с фильтром на 450 нм и 620-650 нм. В рабочем состоянии установить считыватель на нуль.

* Промывки состоят из использования разбавленного промывочного буфера для заполнения до края каждой лунки, вытряхивая содержимое и обратного заполнения лунки в общем количестве 3 раза. Избегайте образования пузырьков в лунках в течение этапов промывки.

Контроли должны быть включены во время каждой процедуры.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ - визуальная:

Реактивный: Любая лунка с образцом, которая имеет явный и насыщенный желтый цвет.

Нереактивный: Любая лунка с образцом, которая не имеет четкого желтого цвета.

ЗАМЕЧАНИЕ: Отрицательный контроль, также как и некоторые образцы, может демонстрировать некоторый слабый цвет.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ – ELISA считыватель:

В рабочем режиме установите на нуль планшетный считыватель ELISA. Считайте все лунки, используя бихроматическое считывание с фильтрами в 450 и 620-650 нм.

Реактивный: мера поглощения света считывания 0.15 и выше указывает на содержание образцом антигена веротоксина.

Нереактивный: мера поглощения света считывания меньше чем 0.15 указывает, что образец не содержит обнаруживаемых уровней антигена веротоксина.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны использоваться как вспомогательное средство в диагностике и не должны интерпретироваться как сам диагноз.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Нормальные здоровые люди не должны иметь веротоксина и должны давать отрицательные результаты. Положительная реакция указывает, что пациент сбрасывает обнаруживаемые количества антигена веротоксина. Случаи инфекции веротоксина значительно отличаются между совокупностями, порой года, и географическими регионами. Никакой ожидаемый уровень распространенности не может быть установлен.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование положительного и отрицательного контролей позволяет легко проверять стабильность набора. Для действительного анализа положительный контроль должен быть более чем 0.5 единиц ОП, и отрицательный контроль должен быть ниже 0.15 единиц ОП. Если значения вне этих диапазонов, набор не должен использоваться.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изучение #1 – против SMAC

К-во = 110

	SMAC	
	+	-
DAI	+	12
	-	2
		94

Чувствительность: 12/14 = 86%

Специфичность: 94/96 = 98%

Изучение #2 – против другого ELISA набора

К-во = 110

	Другой ELISA набор	
	+	-
DAI	+	12
	-	0
		97

Чувствительность: 12/12 = 100%

Специфичность: 97/98 = 99%

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
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com