



## Набор ИФА для качественного определения веротоксина *E.coli* в стуле

Каталог. № :8303-3  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 24-06-2008

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ELISA набор компании ДАИ 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 давить 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 течении 30 минут, затем промыть\*.
5. Добавить в каждую лунку по 2 капли реагента 1 (синий раствор).
6. Инкубировать при комнатной температуре в течении 30 минут.
7. Добавить в каждую лунку по 2 капли реагента 2 (красный раствор).
8. Инкубировать при комнатной температуре в течении 30 минут.
9. Добавить в каждую лунку по 2 капли хромогена.
10. Инкубировать при комнатной температуре в течении 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.

Информация для заказа:

#### 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.

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
а/я 742  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775 612  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)

#### 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
	-	2	94

**Чувствительность: 12/14 = 86%**

**Специфичность: 94/96 = 98%**

Изучение #2 – против другого ELISA набора  
К-во = 110

	Другой ELISA набор		
		+	-
DAI	+	12	1
	-	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.

#### Литература:

(См. в оригинале инструкции).