

НАБІР ІФА ДЛЯ СКРИНІНГУ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ НА НАЯВНІСТЬ АНТИГЕНУ E.COLI 0157

8322-3, E.Coli 0157 Antigen Detection (In Food)

Каталог. №: 8322-3

Методика від 07-15-2009

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

ПРИЗНАЧЕННЯ ЗАСТОСУВАННЯ

Набір **DAI E.Coli 0157** являє собою імуноферментний аналіз твердої фази (ELISA), який може бути використаний для скринінгу харчових продуктів на наявність антигенів *E.Coli 0157*.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір ІФА *E.Coli 0157* є аналізом подвійного антитіла («сандвіч»), який використовує специфічні антитіла анти-*E.Coli 0157*, нанесені в лунки. Після додавання зразка та ферментного кон'югату, позитивна реакція (що вказує на присутність антигену *E.Coli 0157*) призводить до темно синього забарвлення. Додавання стоп розчину зупиняє аналіз і перетворює синій колір на жовтий. Результати можуть бути зчитані візуально або за допомогою зчитувача ELISA.

РЕАГЕНТИ

- Мікролункові тестові смужки, покриті поліклональними антитілами анти-*E.Coli 0157*: 96 лунок.
- Тримач смужок: один (1).
- Ферментний Кон'югат: 1 (одна) пляшка, що містить 11мл поліклональних антитіл анти-*E.Coli 0157*, кон'югованих з пероксидазою, з барвником червоного кольору та консервантом.
- Позитивний Контроль: Один (1) флакон, що містить 1 мл мертвих клітин *E.Coli 0157* в буферній основі.
- Негативний контроль: 1 (один) флакон з 1 мл буферної основи.
- Хромоген: Один (1) флакон, що містить 11 мл хромогену Тетраметилбензидину (ТМБ).
- Промивний концентрат 20X: Два (2) флакони, що містять 25 мл концентрованого буфера і сурфактанта з консервантом.
- Стоп розчин: один (1) флакон, що містить 11 мл 1М фосфорної кислоти.

Додаткові Необхідні матеріали:

- Stomacher (Tekmar Stomacher лабораторний блендер 400) або блендер
- Інкубатор для струшування або аналогічний інкубатор
- Microelisa рідер, здатний зчитувати біхроматично при 450/650 нм (опційно)
- Інкубатор, 37 °С
- Піпетки, 100 мкл
- Одноразові наконечники для мікропіпеток
- Мікробіологічне середовище та антибіотики для приготування необхідних розчинів по збагаченню: Новобіоцин (Сігма N1628) Модифікований збагачувальний розчин ЄС (BBL # 11187 або Діфко # 0314-01-0)
- Відповідні контейнери для зберігання та утилізації матеріалів, забруднених інфекційними агентами
- Листки запису даних
- Дезинфікуючий розчин

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Не використовуйте розчини, якщо вони випадають в осад або стають мутними.
- Виняток: Промивний концентрат може випадати в осад при зберіганні в холодильнику, але розчиняється після нагрівання.
- Не додавати азиди в зразки або в реагенти.
- Деякі реагенти містять консервант.
- Поводитись з реагентами та зразками як з потенційно інфекційним матеріалом. Будьте обережні, щоб не допустити

утворення аерозолів і знезаражувати будь-яке розбризкування зразків.

- Промивка має вирішальне значення для належного виконання тесту.

ЗБЕРІГАННЯ

Реагенти, смужки і компоненти в пляшках: Зберігати при 2 -7 °С. Гнучка пляшка з розведеним промивальним буфером може зберігатися при кімнатній температурі.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Промивний буфер - Зніміть ковпачок і додайте вміст однієї пляшки промивального концентрату в гнучку пляшку з 475 мл дистильованої води. Перемішати. Гнучка пляшка повинна мати вузький наконечник для оптимізації промивань.

ПІДГОТОВКА СЕРЕДОВИЩА

Збагачувальний Розчин ЄС з Новобіоцином (mEC + n)

1. Змішайте наступні компоненти з 1 л дистильованої води (якщо приготоване середовище не використовується):

Триптон	20.0 г
Лактоза	5.0 г
K ₂ HPO ₄	4.0 г
KN ₂ PO ₄	1.5 г
NaCl	5.0 г
Солі жовчних кислот # 3	15 г

pH до 6.9 ± 0.1
2. Автоклавувати при 121 °С протягом 15 хвилин.
3. Дозволити охолонути до кімнатної температури і додати 1 мл стерилізованого фільтруванням водного розчину 20 мг/мл Новобіоцину. (Для 225 мл додати 0.225 мл розчину Новобіоцину). Кінцева концентрація повинна бути 20 мкг/мл.

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

1. Додати 225 мл mEC+n до 25 г харчового продукту в стерильний пакет Stomacher або в ємність блендера.
2. Подрібнити або перемішати зразок і збагачувальний розчин протягом 2 хвилин.
3. Перемістити пакет Stomacher в шейкер при 37 °С або, альтернативно перемістити вміст блендера в стерильну колбу і прикріпити до шейкера.
4. Інкубувати пакети Stomacher або колби при 37 °С при струшуванні (120 оборотів в хвилину) протягом 18 годин.
5. Взяти 1 мл аліквоти з кожного зразка і помістити в окрему чисту пробірку з кришкою, що закручується. Це і є зразок, який буде використовуватися в аналізі.

ПРОЦЕДУРА

1. Відірвати необхідну кількість лунок (кількість зразків плюс 2) і помістити в тримач.
2. Додати 2 краплі (100 мкл) негативного контролю в лунку № 1 і 2 краплі (100 мкл) позитивного контролю в лунку № 2 (обидва використовувати не розведеними).
3. Додати 2 краплі (100 мкл) випробуваного зразка у відповідну лунку.
4. Інкубувати при кімнатній температурі (15-25 °С) протягом 30 хвилин, потім промити.*
5. Додати 2 краплі ферментного кон'югату (червоний розчин) у кожну лунку.
6. Витримати протягом 30 хвилин, потім промити*. **Промити лунки один раз дистильованою водою.** Витрясти зайву рідину на рушник.
7. Додати 2 краплі хромогену в кожну лунку.
8. Інкубувати протягом 10 хвилин.
9. Додайте 2 краплі стоп-розчину в кожну лунку. Перемішати лунки, обережно постукуючи тримач смужок вказівним пальцем.
10. Зчитати результати візуально або при 450/620-650 нм.

* Кожне промивання складається з видалення вмісту лунок у відповідний контейнер з дезінфікуючим розчином (наприклад, 3 % розчин відбілювача у воді) і використання розведеного промивного буфера, щоб заповнити кожну лунку, перемішати вміст і заповнити лунки в цілому 3 рази. Зразки з липкими частинками можуть потребувати більш ретельного промивання, ніж інші зразки. Існує потенційна можливість хибно позитивних результатів, якщо зразок не ретельно вимитий з лунки перед додаванням наступних реагентів.

Тільки один набір контролей потрібен для аналізу.

Зчитати результати протягом 4 годин з моменту додаванням стоп розчину.

Всі інкубації відбуваються при кімнатній температурі (15-25 °С).

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ - ВІЗУАЛЬНА

Позитивний результат: Будь-яка лунка, яка має значний і очевидний жовтий колір.

Негативний результат: Будь-яка лунка, яка не має значного і очевидного жовтого кольору.

ПРИМІТКА: Негативний контроль, а також деякі зразки, можуть демонструвати слабе забарвлення. Лунка зі зразком повинна бути явно темнішою, ніж лунка з негативним контролем, щоб результат був прийнятий як позитивний.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ – ЗЧИТУВАННЯ ОПТИЧНИХ ЩІЛЬНОСТЕЙ

Позитивний: Значення ОЩ 0.20 і вище.

Негативний: Значення ОЩ менші за 0.20.

Тестові Обмеження

Дослідження посівів показали, що цей аналіз має межу виявлення приблизно 1000 CFU/мл, в залежності від штаму кишкової палички O157, який тестується.

Збагачення потрібно протягом 16-18 годин для оптимального росту палички O157 E.Coli. Зразки зі значеннями, меншими 1 CFU/г, були послідовно позитивним у ELISA після 18 годин збагачення.

Наступні мікроорганізми були випробувані в дослідженнях посівів на реактивність в цьому випробуванні. Наступні результати були отримані:

<i>E. coli</i> O157:NM (+)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (-)
<i>E. coli</i> O157:H19 (+)	<i>Brucella abortus</i> (phenol) (-)
<i>E. coli</i> O157:H12 (+)	<i>Citrobacter freundii</i> (-)
<i>E. coli</i> O26:H11 (-)	<i>Enterobacter cloacae</i> (-)
<i>E. coli</i> 055 (-)	<i>Hafnia alvei</i> (-)
<i>E. coli</i> 088:H49 (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)
<i>E. coli</i> 091:21 (-)	<i>Salmonella urbana</i> (030) (wk)
<i>E. coli</i> 0111:NM (-)	<i>S. typhimurium</i> (-)
<i>E. coli</i> 0163:NM (-)	<i>Xanthomonas maltophilia</i> (-)
<i>E. hermannii</i> (-)	<i>Yersinia enterocolitica</i> 09 (-)

Сальмонела Urbana дала позитивний результат у цьому ELISA. Цей організм рідко зустрічається у великої рогатої худоби. Позитивні результати були отримані в ELISA, як і очікувалося, для штамів E.Coli O157, які не містять Verotoxin.

Речовини, вплив яких може призвести до помилкових результатів, не були визначені. Проте, середовища, крім перерахованих, повинні бути кваліфіковані перед використанням у цьому ELISA.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Позитивні і Негативні контролю повинні використовуватися кожен раз, коли проводиться аналіз.

Для дійсного результату, Негативний контроль повинен бути нижче 0.12 ОЩ і Позитивний Контроль більший, ніж на 1.0 одиниць ОЩ. Якщо один з контролей знаходиться поза діапазоном, не використовуйте комплект і зверніться до Технічної служби.

Проблема: Негативний контроль значно розвинув колір.

Корекція: Промивання було недостатнім. Повторіть тест з більш інтенсивнішим промиванням.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com