

Набор для быстрого определения общих колиформных бактерий

CheckLite CT 150 - набор для определения колиформных бактерий, В основе методики лежит высокочувствительное биолуминометрическое исследование на β -галактозидазу колиформных бактерий.

CheckLite CT 150 – более чувствительный метод определения, чем колориметрическое исследование.

CheckLite CT 150 – **качественный тест** (на присутствие или отсутствие колиформ), система не производит количественный подсчет бактерий.

Принцип измерения

CheckLite CT 150 ферментативный тест на присутствие общих колиформ, основанный на определении β -галактозидазы. Рекомендуемая среда содержит сурфактант, способствующий росту только Грам⁻ бактерий. Реагент для определения «Detection reagent CT 150» содержит D- Люциферин- O - β -галактопиранозид (LuGal), производное соединения люциферазы и β -галактозидазы. Люциферин высвобождается из LuGal при взаимодействии с β -галактозидазой колиформных бактерий, вызывает реакцию сопровождающуюся образованием люциферазы и сопровождающуюся люминесценцией (свечением). Количество биолуминесценции производимое в данной реакции прямо пропорционально количеству β -галактозидазы в исследуемой культуре и отдельных клетках колиформных бактерий. Высокочувствительное биолуминометрическое исследование на β -галактозидазу является более быстрым методом, чем колориметрическое исследования на колиформы.

Хранение набора

Набор хранится в холодильнике при 2-8 °С. Хранить восстановленный (в который уже добавлен растворитель) детекционный реагент при 2-8 °С, если он будет использован в течение дня, и ниже – 20 °С, если будет использоваться в течение недели. Когда используется восстановленный и сохраняемый реагент, проверьте Уровень 1 и Уровень 2 (см. Приготовление реагента).

Состав набора

А. Реагент для определения, детекции колиформ «**Detection reagent CT 150**»:

5 пузырьков с зеленой этикеткой (содержит D- Люциферин - O - β -галактопиранозид, рекомбинант люциферазы светлячков и АТФ в лиофилизированной форме)

Б. Вода – растворитель «**Solvent water CT 150**»:

5 пузырьков розового цвета по 6,3 мл – содержит ультра чистую воду для растворения реагента для определения «Detection reagent CT 150»

В. Реагент для лизиса бактериальных клеток «**Permeabilizer CT 150**»

5 мл x 2 пузырька фиолетового цвета – содержит сурфактант (5% бензалкониум хлорид) для отделения колиформных клеток друг от друга.

Д. Позитивный контроль «**Positive Control CT 150**»:

1 пузырек голубого цвета на 2 мл – содержит β -галактозидазу E. Coli

Приготовление реагентов

Приблизительно за час до окончания стадии селективного обогащения, необходимо приготовить детекционный реагент. Необходимо приготовить достаточное количество реагента, чтобы была возможность исполнить в двое большее количество исследований, чем количество образцов (один - контрольный для проверки работы собственно самого реагента). Один пузырек содержит количество реагента, достаточное для проведения 30 исследований, т.е. на 28 реально исследуемых образцов.

1 Растворение: Чистая вода – растворитель «Solvent water CT 150» из розового пузырька заливается в зеленый пузырек - реагент для определения «Detection reagent CT 150». Помешивайте пузырек аккуратно, чтобы не образовывались комочки. Перемешивайте до полного растворения «Detection reagent CT 150».

2 Перемешивание: Если вы растворяете более чем один пузырек, то перемешивайте реагенты в чистой тубе или бутылке (чтобы исключить возможность контаминации бактериями, содержащими β-галактозидазу). Если в первом контрольном измерении (пробирка №1) (см. пункт 4 Б) определяется уровень, более чем 800 RLU, то туба или бутылка могут быть контаминированны.

3 Перенос: Приготовить в два раза больше ЛюмиТуб, чем тестируемых образцов. Добавить 200 мкл детекционного реагента «Detection reagent CT 150» в каждую тубу. Затем инкубировать от 30 мин до 1 часа при комнатной температуре (20 -30⁰С) (люминесценция стабильная в этот период).

4 Проверка:

А) Протрите вокруг крышки камеры люминометра 70-80% раствором спирта, чтобы удалить микрочастицы люциферина, которые могли распылиться во время предыдущего исследования.

Б) Измерьте количество биолуминесценции (в RLU – относительных световых единицах) в инкубированной тубе (значение №1) на люминометре.

В) Выньте новую тубу (значение №2) и добавьте 40 мкл позитивного контроля «Positive Control CT 150» - пузырек голубого цвета и оставьте его на 5 – 30 мин (люминесценция стабильная в этот период).

Г) Измерьте RLU в другой тубе (значение №2). Проверьте, измерение считается правильным, если уровень RLU в тубе (значение №2) по крайней мере в 20 раз выше чем в тубе (значение №1). Если нет, то вполне возможно произошла контаминация β-галактозидазой или реагент не работает. Приготовьте новый реагент и проверьте снова.

Требуемое оборудование и материалы

1 Среды для селективного обогащения: CT Medium (0,55% Nutrient broth №2 (Oxoid), 0,078% Triptone (Difco.), 0,39% NaCl, mM IPTG, pH 7,3), XM Broth (Elmex, Tokio) или XM - 50 (Elmex, Tokio)

2 Lumitester C -100 (Scil Diagnostics)

3 LumiTube (Scil Diagnostics)

4 Подставка для туб

5 Инкубатор

6 20-100 мкл

7 Перчатки

8 Спирт 70-80%

9 Автоклав

Отбор образцов и приготовление

Пре - инкубация тестируемой среды:

До проведения теста необходимо пре – инкубировать тестируемую среду при 37⁰С (обычно берут большее количество среды, чем количество исследуемых образцов).

Техника отбора проб:

А) Сваб тест:

Смочить swab в стерильном физ. Растворе. Протереть swabом руки, стеклянную посуду или другие поверхности. Осторожно, не контаминируйте swab до момента использования. Погрузите swab в 2 мл СТ среды или ХМ бульона и перенесите попавшие на swab микроорганизмы в среду. Когда протираете сильно загрязненную поверхность, то погрузите swab в буфер и (1 -10 мл) и используйте кратный объем (0,1 мл) для селективного обогащения. Держите оставшиеся образцы в холодильнике для измерения пустой пробы (бланк измерения)

Б) Пищевая и молочная продукция:

Исследуются жидкие образцы, если образец твердый, то производится экстракция, с использованием буфера, в основном фосфатный буфер. Оставшийся исследуемый образец или экстракт необходимо содержать в холодильнике для измерения пустой пробы (бланк измерения)

Не приготовленная пища иногда может содержать значительное количество β -галактозидазы, которая увеличивает значение пустой пробы (бланк измерения) и делает исследование менее чувствительным. Количество среды, в которое инокулируется исследуемый образец должно быть в 10 раз больше (соотношение 1:10).

С) Исследование воды:

Растворить 50 мл исследуемой воды в 500 мл ХМ – 50.

Стадия селективного обогащения:

Инкубировать тестируемую среду при 37⁰С в течение 5 часов (можно до 24 часов) без перемешивания. Определенное время инкубации указано в таблице №1. Не забывайте инкубировать среду, которая не инокулирована, вместе с образцами для измерения пустой пробы (бланк измерения)

Колиформы	Время инкубации
Eschrichia coli IAM12119	5 часов
Citrobacter freundii JCM1657	7 часов
Enterobacter cloacae IAM12349	6 часов

*Исходно тестируется 10 КОЕ в 2 мл исследуемой среды

Процедура проведения исследования

1 Лизис клеток: Добавить 40 мкл реагента для лизиса бактериальных клеток «Permeabilizer СТ 150» к 2 мл исследуемого образца, и аккуратно перемешать. В случаях, когда используется большее количество образца, то необходимо исходить из соотношения 1/50 (реагент/образец). Раствор обычно становится белого цвета и мутным. (После данной процедуры образец становится стерильным, но будьте осторожны, не пролейте образец до добавки данного реагента).

2 Добавить тест образец в реагент **в течение одной минуты после лизиса клеток** (не позднее) (иначе β -галактозидаза выделенная из колиформных клеток может быть инактивированна) Добавляется 40 мл тестируемого образца в ЛюмиТубу, где содержится 0,2 мл детекционного реагента. Если у вас много тестируемых образцов, то повторите операцию снова. Необходимо оставить тестируемый образец на 10-30 мин при комнатной температуре. Люминесцентная активность образца остается стабильной (сохраняться) в течение 30 минут при комнатной температуре.

3 Производится измерение исследуемого образца на приборе Lumitester С -100 (количество RLU).

4 Измерение пустой пробы (бланк измерение): Взять не инокулированную тест среду и исполнить операции с 1 по 3 (согласно процедуре проведения исследования) таким же образом (Значение №3). Если образцы были взяты с сильно загрязненной поверхности, на пищевом или молочном предприятии, то необходимо использовать смесь образцов или экстракты, взятые из

холодильника и инкубировать среду в таком же соотношении, как и для исследуемых образцов со средой обогащения вместо только одной среды. Измерение №3, которое является бланк измерением (пустой пробой), является очень важным для интерпретации результатов. Если Измерение №3 превышает 3000 RLU, это означает, что образец содержит значительное количество β -галактозидазы, которое делает исследование менее чувствительным.

Интерпретация результатов

Тест образец считается положительным (наличие колиформ), когда полученное измерение с исследуемого образца выше чем в 2 раза бланк измерения (Измерения №3). Если измерение с исследуемого образца в 1,5 раза больше, но меньше, чем в 2 раза, образец может быть колиформ позитивным. В таких случаях рекомендуется тестировать образец с более длительным временем селективного обогащения (обычно образец, выдержанный в селективной среде на 1-2 часа больше, может прояснить результат). Если результат меньше чем в 1,5 раза, то результат считается негативным (отсутствие колиформ).

Внимание

Набор CheckLite СТ 150 не рекомендуется использовать для диагностики заболеваний людей и животных. Набор создан для использования, близко с соответствующей асептической техникой для изоляции и идентификации микроорганизмов. Не допускать попадания реагентов набора на кожу и в глаза. В случае попадания в глаза или на кожу немедленно смыть водой и обратиться к врачу.

Хранить в месте, специально предназначенном для реагентов, защищенном от контакта с детьми. Не допускать контаминации реагентами и исследуемыми образцами пищи или пищевой продукции.