

INSTRUKCJA WYKONANIA TESTU

ZESTAW DIAGNOSTYCZNY LATEKS EPEC przeznaczony jest do wykrywania i identyfikacji somatycznych antygenów enteropatogennych pałeczek *Escherichia coli* w hodowlach tych drobnoustrojów w podłożu płynnym.

ZESTAW PRZEZNACZONY JEST DO BADAŃ Z UŻYCIEM MATERIAŁU POCHODZENIA LUDZKIEGO (KLINICZNEGO).

SKŁAD ZESTAWÓW LATEKS EPEC

Zestaw składa się z 4 opakowań o następującej zawartości:

Lateks EPEC - opakowanie nr 1	
Odczynnik wieloważny A (dla O26, O55, O111, O127, O142)	3 x 5 ml
Odczynnik wieloważny B (dla O86, O119, O124, O125, O126, O128)	3 x 5 ml
Odczynnik wieloważny C (dla O25, O44, O114)	3 x 5 ml
Lateks kontrolny	3 x 5 ml
Płytki szklane do badań	4 szt.
Pałeczki-mieszadélka	5 opakowań
Instrukcja wykonania testu	
Lateks EPEC - opakowanie nr 2	
Odczynnik E.c O26	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O55	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O111	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O127	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O142	1 x 2 ml
Wieloważny antygen kontrolny A (dla O26, O55, O111, O127, O142)	1 x 1 ml
Pałeczki-mieszadélka	3 opakowania
Instrukcja wykonania testu	
Lateks EPEC - opakowanie nr 3	
Odczynnik E.c O86	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O119	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O124	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O125	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O126	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O128	1 x 2 ml
Wieloważny antygen kontrolny (dla O86, O119, O124, O125, O126, O128)	1 x 1 ml
Pałeczki-mieszadélka	3 opakowania
Instrukcja wykonania testu	
Lateks EPEC - opakowanie nr 4	
Odczynnik E.c O25	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O44	1 x 2 ml
Odczynnik E.c O114	1 x 2 ml
Wieloważny antygen kontrolny C (dla O25, O44, O114)	1 x 1 ml
Pałeczki-mieszadélka	3 opakowania
Instrukcja wykonania testu	

Butelki z odczynnikami wyposażone są w zakrętki z pipetami (zakraplaczami) umożliwiającymi dozowanie kropli o objętości 25-27 μ l.

WYKONANIE ODCZYNU LATEKSOWEGO

Odczyn lateksowy wykonuje się w dwóch etapach: w pierwszym etapie z odczynnikami wieloważnymi A, B, C i lateksem kontrolnym, w drugim etapie z zestawem odczynników jednoważnych odpowiednim do uzyskanego dodatniego wyniku pierwszego etapu badania.

1. Przygotowanie próbki do badania

Do izolacji kolonii w toku poszukiwania enteropatogennych szczepów *E. coli* wykorzystuje się rutynowo posiane pożywki Mac Conkey’a lub Levine’a. Należy izolować nie mniej niż 10 typowych, laktozododatnich kolonii przypominających swoim wyglądem kolonie pałeczek *E. coli*.

Materiał pobrany z każdej kolonii posiewa się równolegle na wodę peptonową z tryptofanem oraz podłoże z malonianem sodu. Po 18 – 20 godzinach inkubacji należy odczytać wyniki reakcji w podłożu z malonianem sodu i do dalszego toku badania przeznaczyć tylko hodowle izolatów malonianoujemnych. Hodowle bakteryjne w wodzie peptonowej (odpowiadające hodowlom izolatów malonianoujemnych), bez dodawania do nich odczynnika Ehrlicha, należy ogrzewać przez 15 min. we wrzącej łaźni wodnej. Po ogrzaniu, próbki hodowli należy wymieszać, pozostawić do ostudzenia w temperaturze pokojowej a następnie wykonać z nimi odczyn lateksowy.

Uwagi:
- po wykonaniu odczynu lateksowego, do każdej hodowli w wodzie peptonowej z tryptofanem należy dodać odczynnik Ehrlicha dla stwierdzenia obecności indolu,
- hodowle izolatów w podłożu z malonianem sodu służyć jako materiał do dalszej biochemicznej i serologicznej identyfikacji bakterii oraz do oznaczenia ich lekowrażliwości.

Odczyn lateksowy można także wykonać z zawiesinami masy bakteryjnej zebranej z podłoża stałego z 10 typowych kolonii. W tym celu masę bakteryjną pobraną z każdej badanej kolonii należy rozproszyc w 0,2 ml PBS lub soli fizjologicznej, ogrzać w płomieniu palnika do wrzenia, odstawić do ostudzenia, a następnie wykonać z tak przygotowanymi zawiesinami odczyn lateksowy.

2. Przebieg badania

Odczynniki lateksowe należy wyjąć z chłodni, na okres wystarczający do osiągnięcia temperatury pokojowej, a bezpośrednio przed użyciem dokładnie wymieszać przez wstrząsanie butelkami.

Na cztery wydzielone pola płytki szklanej należy nanieść po 25 μ l próbki badanej hodowli a następnie kolejno po 1 kropli odczynnika wieloważnego A, odczynnika wieloważnego B, odczynnika wieloważnego C i lateksu kontrolnego. Po dokładnym wymieszaniu reagentów pałeczkami z tworzywa sztucznego należy umieścić płytkę w wilgotnej komorze na wytrząsarce i kołysać przez 3 minuty przy 120 cyklach na minutę. Dopuszczalne jest kołysanie płytki w ręku.

Do dalszego badania przy użyciu odczynników jednoważnych przeznacza się tylko te próbki, z którymi w pierwszym etapie uzyskano dodatnią reakcję z odczynnikiem wieloważnym przy braku reakcji z lateksem kontrolnym. Każdą taką próbkę należy nanieść po ok. 25 μ l na pola płytki szklanej, a następnie dodać kolejno po kropli odpowiedniego odczynnika jednoważnego: O26, O55, O111, O127, O142 – jeżeli dodatnia reakcja wystąpiła z wieloważnym odczynnikiem A; O86, O119, O124, O125, O126, O128 - jeżeli dodatnia reakcja wystąpiła z wieloważnym odczynnikiem B oraz O25, O44, O114 - jeżeli dodatnia reakcja wystąpiła z wieloważnym odczynnikiem C. Po dokładnym wymieszaniu reagentów pałeczkami z tworzywa sztucznego należy umieścić płytkę w wilgotnej komorze na wytrząsarce i kołysać przez 3 minuty przy 120 cyklach na minutę. Dopuszczalne jest kołysanie płytki w ręku.

Uwagi:
- przy dozowaniu odczynników diagnostycznych i lateksu kontrolnego nie dotykać końcówką zakraplacza badanych hodowli naniesionych na płytkę
- każda pałeczka-mieszadélko może być użyta tylko jeden raz
- szklane płytki po badaniu należy dokładnie umyć w wodzie z detergentem, splukać i wytrzeć do sucha

WYNIKI I ICH INTERPRETACJA

Wyniki testu należy odczytywać przy użyciu lupy (5 x) według umownej 6- punktowej skali:

- 5 – gruboziarnista aglutynacja; aglutynaty rozmieszczone w całej kropli lub tylko na jej obwodzie,
- 4 – intensywna, drobnogrudkowa aglutynacja 100% cząstek lateksu, tło przejrzyste,
- 3 – drobnogrudkowa aglutynacja 50% cząstek lateksu, w kropli dostrzegalne lekkie zmętnienie,
- 2 – aglutynacja mniej niż 50% cząstek lateksu, wyraźne zmętnienie kropli,
- 1 – ślady reakcji zlepnej,
- 0 – kropla jednolicie mętna; reakcja ujemna.

Za dodatnią przyjmuje się reakcję ocenianą co najmniej na 3 punkty, która występuje w czasie do 3 minut kołysania próbki z odczynnikiem diagnostycznym.

Za diagnostycznie znamioną, świadczącą o obecności w badanej próbce somatycznych antygenów enteropatogennych pałeczek *E. coli* (EPEC) należących do danej grupy, przyjmuje się wystąpienie dodatniej reakcji zlepnej z odczynnikiem wieloważnym i jednym z odczynników jednoważnych przy braku reakcji z lateksem kontrolnym.

Wystąpienie reakcji z lateksem kontrolnym wyklucza możliwość interpretacji wyniku badania danej próbki w odczynie lateksowym.

Diagnostycznie znamienne reakcje badanej próbki z więcej niż jednym odczynnikiem jednoważnym mogą wskazywać na obecność w badanej próbce enteropatogennych pałeczek *E. coli* (EPEC) należących do różnych grup serologicznych. W takim przypadku w toku dalej prowadzonego badania bakteriologicznego należy zwiększyć liczbę kolonii izolowanych w kierunku pałeczek EPEC.

Wystąpienie dodatniej reakcji zlepnej tylko z odczynnikami wieloważnym przy braku reakcji z którymkolwiek z odczynników jednoważnych należy uznać za wynik ujemny, w badaniu ukierunkowanym na wykrycie somatycznych antygenów enteropatogennych pałeczek *E. coli* (EPEC).

Stwierdzenie obecności jakiegokolwiek grupowego antygeny enteropatogennych pałeczek *E. coli* (EPEC) w danej próbce nie upoważnia do wydania wyniku o wyhodowaniu pałeczek EPEC i wymaga prowadzenia dalszego badania diagnostycznego w tym kierunku.

CZUŁOŚĆ I SWOISTOŚĆ TESTU

1. Czulość testu

- Odczynniki wieloważne A, B i C wykrywają somatyczne antygeny enteropatogennych pałeczek *E. coli* (EPEC) w zawiesinach gładkich szczepów o zawartości 4×10^7 komórek/ml i większej.
- Odczynniki jednoważne dla grupy O25, O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142 wykrywają homologiczne antygeny somatyczne pałeczek *E. coli* (EPEC) w zawiesinach odpowiednich gładkich szczepów o zawartości 4×10^7 komórek/ml i większej.

2. Swoistość testu

- Odczynniki jednoważne dla grupy O25, O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142 nie reagują krzyżowo z heterologicznymi antygenami somatycznymi pałeczek *E. coli* (EPEC) w zawiesinach odpowiednich gładkich szczepów o zawartości 6×10^8 komórek/ml i mniejszej.
- Lateks kontrolny nie aglutynuje z zawiesinami gładkich szczepów enteropatogennych pałeczek *E. coli* (EPEC) o zawartości 6×10^8 komórek/ml i mniejszej. Nie aglutynuje z antygenami kontrolnymi.
- Wieloważny antygen kontrolny A aglutynuje z odczynnikami wieloważnym A, odczynnikami jednoważnymi dla grupy O26, O55, O111, O127 i O142, nie aglutynuje z lateksem kontrolnym.
- Wieloważny antygen kontrolny B aglutynuje z odczynnikami wieloważnym B, odczynnikami jednoważnymi dla grupy O86, O119, O124, O125, O126 i O128, nie aglutynuje z lateksem kontrolnym.
- Wieloważny antygen kontrolny C aglutynuje z odczynnikami wieloważnym C, odczynnikami jednoważnymi dla grupy O25, O44 i O114, nie aglutynuje z lateksem kontrolnym.
- Odczynniki wieloważne A, B i C oraz odczynniki jednoważne dla grupy O25, O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142 w rzadkich przypadkach mogą reagować ze szczepami innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* posiadającymi niektóre epitopy antygenowe identyczne jak pałeczki EPEC.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Odczynniki wchodzące w skład zestawu służą jedynie do diagnostyki *in vitro*.
2. Zachować środki ostrożności przewidziane przy pracy z materiałem zakaźnym.
3. Należy unikać kontaktu odczynnika ze skórą lub z błonami śluzowymi.
4. W przypadku kontaktu ze skórą lub błoną śluzową miejsce przemyć dużą ilością wody.
5. Pozostałości odczynników traktować jako odpady medyczne o kodzie 18 01 07.

UWAGI

- Przedłużanie czasu kołysania próbki z odczynnikami lateksowymi ponad zalecane 3 minuty, może prowadzić do uzyskania nieswoistych reakcji.
- Aktywność odczynników lateksowych należy raz w miesiącu sprawdzać przy użyciu wieloważnych antygenów kontrolnych. Nie używać odczynników po upływie terminu ważności.
- Ponieważ niektóre serie mięsnych peptonów używanych do przygotowywania wody peptonowej mogą nieswoiście reagować z odczynnikami lateksowymi, podłoże to należy sporządzać na bazie peptonu beźmięsnego.
- Odczynniki wchodzące w skład zestawu należy przechowywać w temp. od +4°C do +8°C i chronić przed zamrożeniem.
- Odczynniki po zamrożeniu nie nadają się do użycia.
- Odczynniki lateksowe i antygen kontrolny wchodzące w skład zestawu zawierają 0,099% azydku sodu jako środek konserwujący.



ZESTAW DIAGNOSTYCZNY

LATEKS EPEC

Przedsiębiorstwo Wielobranżowe BIOMEX Spółka z o.o.

30-009 Kraków, ul. Friedleina 4-6, lok. 117