

INSTRUKCJA WYKONANIA TESTU

ZESTAW DIAGNOSTYCZNY LATEKS E. COLI O157 przeznaczony jest do wykrywania i identyfikacji somatycznego antygeny pałeczek *Escherichia coli* O157 w hodowli tych drobnoustrojów w podłożu płynnym.

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

WPROWADZENIE

Enterokrwotoczne pałeczki *E. coli* (EHEC) stanowią bardzo istotną, z klinicznego punktu widzenia, grupę chorobotwórczych pałeczek jelitowych. Wspólną cechą tych drobnoustrojów jest wytwarzanie werotoksyny odpowiedzialnej za ciężki przebieg zakażenia pałeczkami EHEC. Zakażenia te mogą przebiegać pod postacią: krwotocznego zapalenia okrężnicy (HC), zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) i zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP). Najczęściej występującym serotypem wśród enterokrwotocznych pałeczek *E. coli* jest O157:H7.

Materiałem do badania w kierunku pałeczek z grupy O157 *E.coli* powinny być próbki kału pochodzące od dzieci i osób dorosłych z objawami biegunki, szczególnie z obecnością krwi w kale, zazwyczaj niegorączkujących.

SKŁAD ZESTAWU LATEKS E.COLI O157

Odczynnik lateksowy	1 x 5 ml
Lateks kontrolny	1 x 5 ml
Antygen kontrolny	1 x 1 ml
Płytką szklaną do badań	1 szt.
Pałeczki-mieszadła	3 opakowania

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

WYKONANIE ODCZYNU LATEKSOWEGO

1. Przygotowanie próbki do badania

Do izolacji kolonii w toku poszukiwania szczepów *E. coli* O157 wykorzystuje się podłoża: Mac Conkey'a z sorbitolem, Mac Conkey'a z sorbitolem i tellurynem potasu lub Mac Conkey'a z sorbitolem, tellurynem potasu i cefiksimum. Możliwe jest również wykorzystanie każdego innego komercyjnego podłoża służącego do izolacji enterokrwotocznych pałeczek *E. coli*. W wyjątkowych przypadkach można izolować kolonie z podłoża MacConkey'a jednak należy pamiętać o braku w nim czynnika różnicującego pozwalającego na odróżnienie potencjalnie chorobotwórczych szczepów *E. coli* od szczepów należących do fizjologicznej flory jelitowej. Z podłoża zawierających sorbitol należy po 18-20 godzinach inkubacji izolować 10 sorbitoloujemnych kolonii.

Materiał pobrany z każdej kolonii posiewa się równolegle na wodę peptonową z tryptofanem oraz podłożę z malonianem sodu. Po 18-20 godzinach inkubacji należy odczytać wyniki reakcji w podłożu z malonianem sodu i do dalszego badania przeznaczyć tylko hodowle izolatów malonianoujemnych. Hodowle bakteryjne w wodzie peptonowej (odpowiadające hodowlom izolatów malonianoujemnym) bez dodania do nich odczynnika Ehrlicha należy ogrzewać w ciągu 15 minut 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 służą 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 rozprawić 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 dwa wydzielone pola szklanej płytki należy nanieść po 25 µl próbki badanej hodowli, a następnie na jedno pole kroplę diagnostycznego odczynnika lateksowego, a na drugie pole kroplę 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/minutę. Odczytać wynik testu. 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-mieszadło może być użyta tylko jeden raz
- szklane płytki po badaniu należy dokładnie umyć w wodzie z detergentem, spłukać i wytrzeć do sucha.

WYNIKI I ICH INTERPRETACJA

- Wyniki testu należy odczytywać przy użyciu lupy (5x) według umownej 6 -punktowej skali:
- 5 - gruboziarnista aglutynacja; aglutynaty rozmieszczone w całej kropli lub tylko na jej obwodzie,
 - 4 - intensywne, drobnogrudekowa aglutynacja 100% cząstek lateksu, tło przejrzyste,
 - 3 - drobnogrudekowa 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 znamienne, świadcząca o obecności w badanej próbce somatycznego antygeny pałeczek *E. coli* O157 przyjmuje się wystąpienie dodatniej reakcji zlepnej z diagnostycznym odczynnikiem lateksowym przy braku reakcji z lateksem kontrolnym.

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

Stwierdzenie obecności somatycznego antygeny pałeczek *E. coli* O157 w badanej próbce hodowli nie upoważnia do wydania wyniku o wyhodowaniu enterokrwotocznych pałeczek należących do tej grupy antygenowej i wymaga dalszych badań w ośrodku referencyjnym dla wykazania zdolności badanych izolatów do wytwarzania werotoksyny i intyminy.

CZUŁOŚĆ I SWOISTOŚĆ TESTU

1. Czulość testu

- Diagnostyczny odczynnik lateksowy wykrywa somatyczny antygen pałeczek *E. coli* O157 w zawiesinach gładkich szczepów o zawartości 4×10^7 komórek/ml i większej.

2. Swoistość testu

- Diagnostyczny odczynnik lateksowy nie reaguje krzyżowo z heterologicznymi antygenami somatycznymi pałeczek *S. sonnei* i enteropatogennych pałeczek *E. coli* (EPEC) w zawiesinach odpowiednich gładkich szczepów o zawartości 6×10^8 komórek/ml i mniejszej.

- Lateks kontrolny nie aglutynuje z zawiesinami szczepów *E. coli* O157 o zawartości 6×10^8 komórek/ml i mniejszej. Nie aglutynuje z antygenem kontrolnym.

- Antygen kontrolny aglutynuje z diagnostycznym odczynnikiem lateksowym, nie aglutynuje z lateksem kontrolnym.

- Diagnostyczny odczynnik lateksowy w rzadkich przypadkach może reagować ze szczepami innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* posiadającymi niektóre epitopy antygenowe identyczne jak pałeczki *E. coli* O157.

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

- Przedłużenie 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 antygeny kontrolnego. 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 temperaturze od $+2^{\circ}\text{C}$ do $+8^{\circ}\text{C}$ i chronić przed zamrożeniem.
- Odczynniki po zamrożeniu nie nadają się do użycia.
- Odczynniki lateksowe i antygen kontrolny wchodzące w skład zestawu zawierają 0,099 % azydki sodu jako środek konserwujący.



ZESTAW DIAGNOSTYCZNY LATEKS ESCHERICHIA COLI O157

Przedsiębiorstwo Wielobranżowe BIOMEX Spółka z o.o.
30-221 Kraków, ul. Agrestowa 14