

INSTRUKCJA WYKONANIA TESTU

ZESTAW DIAGNOSTYCZNY LATEKS VTEC przeznaczony jest do wykrywania i identyfikacji somatycznego antygeny pałeczek *Escherichia coli* O26, O103, O104, O111, O121, O145 i O157 w hodowli tych drobnoustrojów w podłożu płynnym.

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

WPROWADZENIE

Werotoksyczne pałeczki *E. coli* (VTEC) stanowią bardzo istotną, z klinicznego punktu widzenia, grupę chorobotwórczych pałeczek jelitowych. Wspólną cechą tych drobnoustrojów jest wytwarzanie werotoksyn odpowiedzialnych za przebieg zakażenia pałeczkami VTEC. Zakażenia te mogą przebiegać pod postacią: krwotocznego zapalenia okrężnicy (HC), zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) i zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP). Werotoksyczne pałeczki okrężnicy mogą należeć do różnych typów serologicznych. Najczęściej występującym serotypem wśród werotoksycznych pałeczek *E. coli* jest O157:H7 lub O157:H-. Szczepy te zazwyczaj nie fermentują sorbitolu. Stwierdzono, że spośród innych *E. coli* niż O157 za najcięższy przebieg zakażenia, zwłaszcza w postaci HUS, odpowiedzialne są najczęściej VTEC należące do grupy antygenowej O26, O103, O104, O111, O121, O145.

Materiałem do badania w kierunku pałeczek VTEC powinny być próbki kału pochodzące od dzieci i osób dorosłych z objawami biegunki, szczególnie z obecnością krwi w kale, zazwyczaj niegorączkujących lub z objawami zespołu hemolityczno-mocznicowego czy też zakrzepowej plamicy małopłytkowej.

SKŁAD ZESTAWU LATEKS VTEC

Diagnostyczny odczynnik lateksowy O26	1 x 2 ml
Diagnostyczny odczynnik lateksowy O103	1 x 2 ml
Diagnostyczny odczynnik lateksowy O104	1 x 2 ml
Diagnostyczny odczynnik lateksowy O111	1 x 2 ml
Diagnostyczny odczynnik lateksowy O121	1 x 2 ml
Diagnostyczny odczynnik lateksowy O145	1 x 2 ml
Diagnostyczny odczynnik lateksowy O157	1 x 2 ml
Lateks kontrolny	1 x 2 ml
Wieloważny antygen kontrolny	1 x 1 ml
Płytko szklana do badań	2 szt.
Pałeczki-mieszadélka	3 opakowania
Instrukcja wykonania testu	1 szt.

Butelki z odczynnikami wyposażone są w zakrętki z pipetami (zakraplaczami) umożliwiającymi dozowanie kropli o objętości 26-27 µl.

WYKONANIE ODCZYNU LATEKSOWEGO

1. Przygotowanie próbki do badania

Do izolacji kolonii w toku poszukiwania szczepów VTEC wykorzystuje się podłoża: Mac Conkey'a, Mac Conkey'a z sorbitolem lub Mac Conkey'a z sorbitolem, telluryne potasu i cefiksimem. Możliwe jest również wykorzystanie każdego innego komercyjnego podłoża służącego do izolacji werotoksycznych pałeczek *E. coli* (podłoża chromogenne).

Z wymienionych podłoży należy po 18-20 godzinach inkubacji izolować po 10 kolonii o wyglądzie charakterystycznym dla *E. coli* w zależności od użytego podłoża.

Materiał pobrany z każdej kolonii posiewa się równolegle na wodę peptonową z tryptofanem oraz podłożo 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 w celu uwolnienia i zabicia bakterii. 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

2. Przebieg badania

Odczynniki lateksowe należy wyjąć z chłodzi, na okres wystarczający do osiągnięcia temperatury pokojowej, a bezpośrednio przed użyciem dokładnie wymieszać przez wstrząsanie butelkami. Na siedem wydzielonych pól szklanej płytki należy nanieść po 25 µl próbki badanej hodowli, a następnie na kolejne pola nanieść po jednej kropli kolejnego odczynnika diagnostycznego a na ostatnie pole kroplę lateksu kontrolnego. Po dokładnym wymieszaniu reagentów pałeczkami z tworzywa sztucznego, zaleca się umieścić płytkę 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-mieszadélko 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 - 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 znamiennej, świadczącej o obecności w badanej próbce danego somatycznego antygeny pałeczek *E. coli* O26, O103, O104, O111, O121, O145 lub O157 przyjmuje się wystąpienie dodatniej reakcji zlepnej z jednym diagnostycznym odczynnikiem lateksowym przy braku reakcji z pozostałymi odczynnikami diagnostycznymi i lateksem kontrolnym.

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

Stwierdzenie obecności somatycznego antygeny pałeczek *E. coli* O26, O103, O104, O111, O121, O145 lub O157 w badanej próbce hodowli nie upoważnia do wydania wyniku o wyhodowaniu werotoksycznych pałeczek należących do tej grupy antygenowej i wymaga dalszych badań w ośrodku referencyjnym dla wykazania zdolności badanych izolatów do wytwarzania werotoksyny i intyminy, tylko werotoksyny (szczepy VTEC) lub tylko intyminy (szczepy EPEC).

CZUŁOŚĆ I SWOISTOŚĆ TESTU

1. Czulość testu

- Diagnostyczne odczynniki lateksowe wykrywają somatyczne antygeny pałeczek *E. coli* O26, O103, O104, O111, O121, O145 lub O157 w zawiesinach gładkich szczepów tych serotypów zawierających 4×10^7 komórek/ml i więcej.

2. Swistość testu

- Diagnostyczny odczynnik lateksowy nie reaguje krzyżowo z heterologicznymi antygenami somatycznymi pałeczek enteropatogennych pałeczek *E. coli* O25, O44, O55, O86, O114, O119, O124, O125, O126, O127, O128 i O142 w zawiesinach odpowiednich gładkich szczepów o zawartości 6×10^8 komórek/ml i mniejszej.

- Lateks kontrolny nie aglutynuje z zawiesinami szczepów *E. coli* O26, O103, O104, O111, O121, O145 lub O157 o zawartości 6×10^8 komórek/ml i mniejszej. Nie aglutynuje z antygenem kontrolnym.

- Wieloważny antygen kontrolny aglutynuje z diagnostycznymi odczynnikami lateksowymi, nie aglutynuje z lateksem kontrolnym.

- Diagnostyczne odczynniki lateksowe w rzadkich przypadkach mogą reagować ze szczepami innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* posiadającymi niektóre epitopy antygenowe identyczne jak pałeczki *E. coli* O26, O103, O104, O111, O121, O145 lub 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 bezmięsnego.**
- 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 % (w/w) azydku sodu jako środek konserwujący.



ZESTAW DIAGNOSTYCZNY LATEKS VTEC

Przedsiębiorstwo Wielobranżowe BIOMEX Spółka z o.o.

30-221 Kraków, ul. Agrestowa 14

DATA AKTUALIZACJI: 01.2025

DO DIAGNOSTYKI IN VITRO