



Návod k použití - LATEX EPEC

Souprava diagnostických činidel je určena k identifikaci O antigenů enteropatogenních bakterií *Escherichia coli* v primárních bakteriálních kulturách.

Složení soupravy

Souprava LATEX EPEC se skládá ze 4 balení v následující sestavě:

LATEX EPEC č.1

Polyvalentní činidlo skupiny A pro 026,055,0111,0127	3 x 5 ml
Polyvalentní činidlo skupiny B pro 086,0119,0124,0125,0126,0128	3 x 5 ml
Polyvalentní činidlo skupiny C pro 025,044,0114	3 x 5 ml
Kontrolní latex	3 x 5 ml
Skleněné destičky s vyznačenými poli	4 ks
Umělohmotné tyčinky	500 ks

LATEX EPEC č. 2

Monovalentní činidlo E. coli 026	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 055	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0111	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0127	1 x 2 ml
Kontrolní antigen skupiny A pro 026,055,0111,0127	1 x 1 ml
Umělohmotné tyčinky	

LATEX EPEC č. 3

Monovalentní činidlo E. coli 086	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0119	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0124	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0125	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0126	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0128	1 x 2 ml
Kontrolní antigen skupiny B pro 086,0119,0124,0125,0126,0128	1 x 1 ml
Umělohmotné tyčinky	

LATEX EPEC č. 4

Monovalentní činidlo E. coli 025	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 044	1 x 2 ml
Monovalentní činidlo E. coli 0114	1 x 2 ml
Kontrolní antigen skupiny C pro 025,044,0114	1 x 1 ml
Umělohmotné tyčinky	

Lahvičky jsou opatřeny uzávěrem s kapátkem umožňujícím dávkování kapek o objemu 25-27 ml.

Provedení testu

Latexový test provádíme ve dvou etapách: v první etapě s polyvalentními činidly skupin A, B, a C, v druhé etapě s činidly monovalentními té skupiny, ve které byla v první etapě získána pozitivní reakce.

Příprava vzorků k vyšetření

K izolaci kolonií enteropatogenních *E. coli* používáme běžně kultury na půdách MacConkey nebo Levine. Doporučujeme izolovat minimálně 10 typických, laktóza pozitivních kolonií, které svým vzhledem připomínají kolonie *E. coli*.

V některých laboratořích je prováděno úspěšné testování dle následujícího postupu:

Souběžně s kultivací je očkovaná půda s tryptofanem a následně je proveden test s polyvalentními latexovými činidly. V případě positivity je teprve provedena izolace asi 3 různých kolonií, které jsou dál testovány monovalentními činidly.

Získaný materiál očkujeme zároveň na peptonovou vodu s tryptofanem (přípravenou dle níže uvedeného rozpisu) a také na půdu s malonátem sodným. Po 18 až 20 hodinách inkubace odečteme výsledky z malonátu a k provedení latexového testu vybereme pouze vzorky „malonát negativní“. Vybrané kultury z peptonové vody ohříváme ve vařící vodní lázni po dobu 15 min. (bez přidávání Ehrlichova činidla). Po zahřátí kulturu promícháme, ochladíme na pokojovou teplotu a provedeme s ní latexový test.

Po provedení latexového testu přidáváme ještě ke každé kultuře na peptonové vodě Ehrlichovo činidlo, abychom zjistili přítomnost indolu.

Průběh vyšetření

Latexová činidla vyjmeme z chladničky pouze na dobu nezbytně nutnou k jejich ohřevu na pokojovou teplotu a bezprostředně před použitím je dobře protřepeme.

Na vymezená políčka sklíčka nanese pipetou 25 ml vzorku zkoumané kultury (každý vzorek na tři políčka) a následovně ke každému vzorku postupně přikápneme pomocí kapátka ve víčku lahvičky 1 kapku (25 µl) polyvalentního činidla skupiny A, skupiny B, skupiny C a kontrolního latexu.

Po důkladném promíchání reagentů umělohmotnou tyčinkou umístíme vzorky na horizontální třepačku a necháme třepat 3 minuty při 120 cyklech /min. při menším počtu vzorku lze promíchávání provést i ručně).

Pro další vyšetření s monovalentními činidly použijeme pouze ty vzorky, ve kterých došlo v první fázi vyšetření k významné pozitivní reakci s některým z polyvalentních činidel při negativní reakci s kontrolním latexem.

Z každého z těchto vzorků nanese pipetou po 25 ml na políčka sklíčka a přidáváme postupně po jedné kapce monovalentního činidla té skupiny, která vyšla pozitivně v první fázi:

- monovalentní činidla 026, 055, 0111 a 0127 v případě pozitivní reakce s polyvalentním činidlem skupiny A,
- monovalentní činidla 086, 0119, 0124, 0125, 0126, 0128 v případě pozitivní reakce s polyvalentním činidlem skupiny B,
- monovalentní činidla 025, 044, 0114 při pozitivní reakci s polyvalentním činidlem skupiny C.

Po důkladném promíchání reagentů tyčinkami a protřepání na třepačce při 120 cyklech/min. po dobu 3 min. můžeme odečítat výsledek reakce.

Výsledky a jejich interpretace

Výsledky se odečítají dle dohodnuté 6-ti bodové škály:

- 5 hrubě zrnitá aglutinace, aglutináty rozmístěné v celé kapce nebo po jejím obvodu
- 4 intenzivní drobnozrnitá aglutinace 100 % latexových částic
- 3 drobnozrnitá aglutinace více než 50% latexových částic, v kapce je možno pozorovat zkalení
- 2 aglutinace méně než 50% latexových částic, výslovné zkalení kapky



- 1 stopy aglutinační reakce
- 0 latex homogenně zkalený
- Za diagnosticky významnou je považována reakce hodnocena minimálně 2 až 3 body, k níž došlo po 3 minutovém třepání vzorku s jedním polyvalentním a s jedním nebo několika monovalentními činidly.
- Významná pozitivní aglutinační reakce s jedním polyvalentním a jedním monovalentním činidlem, při negativní reakci s kontrolním činidlem, svědčí o příslušnosti izolované kultury serotypu *E. coli* dle čísla monovalentního činidla.

Upozornění

Aktivitu činidel je nutno občas ověřit odpovídajícím kontrolním antigenem.

Činidla je nutno přechovávat při teplotě od 2 do 8° C. Chránit před zmrznutím!

Expirační doba je 12 měsíců od data výroby.

Doporučené složení peptonové vody:

Pepto Triptone DIFCO nebo OXOID	10 g
NaCl	5 g
D, L - Tryptofan	1 g
Destilovaná voda	1000 ml

Při použití Pepton Tryptone jiných výrobců než DIFCO nebo OXOID může docházet k nespecifickým aglutinačním reakcím s latexovými činidly.

Příprava půdy:

Rozpustíme složky v destilované vodě, upravíme pH na 7,4-7,5, přefiltrujeme přes filtrační papír a rozlijeme po 2 ml do zkumavek. Sterilizujeme 20 min. při teplotě 121 st C.