

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФБУН ГНЦ ПМБ

_____ И.А. Дятлов

« ____ » _____ 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению диагностического набора реагентов для быстрой идентификации шигатоксинпродуцирующего штамма *Escherichia coli* O104:H4 в реакции латекс-агглютинации.

(Латексная тест-система *E. coli* O104:H4)

1. Назначение тест-системы

Латексная тест-система *E. coli* O104:H4 предназначена для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *Escherichia coli* O104:H4 при проведении клинических лабораторных исследований и представляет собой набор из трех флаконов емкостью 5 мл. Набор рассчитан на 100 определений.

2. Аналитические и диагностические характеристики тест-системы

Специфический латексный тест (фл. № 1) должен давать реакцию агглютинации латекса (РАЛ) с микробной взвесью *E. coli* O104:H4 RKI 112027 на 3(+)-4(+) в концентрации 10^9 м.к./мл и с поз контролем (фл.№ 3)

Специфический латексный тест (фл. № 1) не должен давать РАЛ с микробной взвесью *E. coli* ATCC 51658, , взвесью *E. coli* ATCC 25922 в концентрациях 10^9 м.к./мл.

Контрольный латексный тест (фл. № 2) не должен давать РАЛ с микробными взвесями: *E. coli* O157: H7, штамм ATCC 51658; и *E. coli* O104:H4, штамм RKI 112027 в концентрациях 10^9 м.к./мл и с поз контролем (фл.№3)

Диагностическая чувствительность Латексной тест-системы *E. coli* O104:H4 не менее 80 %, диагностическая специфичность – не менее 90 %

3. Состав тест-системы

В состав Латексной тест-системы *E. coli* O104:H4 входят:

– флакон 1 (специфический латексный тест), содержит 0,5 % взвесь частиц монодисперсного полистирольного альдегидного латекса диаметром 0,65 мкм, сенсibilизированного иммуноглобулинами G, выделенными из сывороток крови кроликов, содержащих антитела к липополисахариду O104 и жгутиковому антигену H4 *E. coli* O104:H4;

- флакон 2 (контрольный тест), содержит 0,5 % взвесь частиц монодисперсного полистирольного альдегидного латекса, сенсibilизированного иммуноглобулинами из сывороток крови не иммунизированных кроликов;
- флакон 3 (позитивный контроль), содержит инактивированную взвесь культуры *E. coli* O104:H4, концентрация 10 единиц по ОСО 42-28-85 П.

4. Принцип действия

Микробные клетки *E. coli* O104:H4, присутствующие в исследуемой пробе, взаимодействуют с латексными частицами, сенсibilизированными антителами против липополисахаридного антигена O104:H4 и жгутикового антигена H4 с последующим образованием видимых агглютинатов. Специфическими мишенями данного теста являются липополисахарид O104:H4 и жгутиковый антиген H4 *E. coli* O104:H4.

5. Меры предосторожности

Потенциальный риск применения Латексной тест-системы *E. coli* O104:H4 класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012 г.)

Подготовку материала для исследования, его обезвреживание, а также уничтожение использованных реагентов Латексной тест-системы *E. coli* O104:H4 проводят с соблюдением специальной техники безопасности в соответствии с СП 1.3.2885-11 «Дополнения и изменения №2 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Утилизацию неиспользованных тест-систем с истекшим сроком годности проводят любым способом, предотвращающим повторное использование по назначению (например, сжиганием).

6. Материалы и оборудование

- 0,01 моль натрий-фосфатный буфер, pH 7,4 (ФБР);
- механические дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,02 и 0,015 мл;
- предметные стекла;
- стеклянные палочки;
- питательные среды для культивирования и выделения *E. coli* O157:H7 «Сорбитол *E. coli* O157:H7агар» производства ФБУН ГНЦ ПМБ (РУ2007/200970), или аналогичные среды других производителей при соответствии требованиям качества и зарегистрированных в установленном порядке.

7. Анализируемые образцы

Подозрительные колонии микроорганизмов (сорбит «-»), выделенные из клинического материала, выращенные на «Сорбитол *E. coli* O157:H7агаре» в аэрофильных условиях в течение 18-24 часов при температуре 37 °С.

Примечание – Анализируемые образцы не подвергать автоклавированию.

8. Подготовка к проведению анализа

Извлечь латексную тест-систему из холодильника и выдержать при комнатной температуре 20 минут.

Примечание – перед применением флакон со специфическим латексным тестом тщательно суспендировать до гомогенного состояния.

9. Проведение анализа

К работе с набором допускаются специалисты, прошедшие соответствующие курсы подготовки и имеющие право работы с микроорганизмами 1-2 групп патогенности.

Взятие, посев и хранение исследуемого материала проводить в соответствии с МУК 4.2.992-00 «Методы выделения и идентификации кишечной палочки *E. coli* O157:H7», МУК 4.2.2963-11 «Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *E. coli*, продуцирующих шига-токсины (STEC-культуры), и обнаружению возбудителей STEC-инфекций в пищевых продуктах».

9.1. Идентификация микробных клеток *E. coli* O104:H4 из колоний, выросших на плотной питательной среде.

На предметное стекло нанести 20 мкл физиологического раствора, стеклянной палочкой снять часть колонии тестируемого штамма (исследуемый образец) и растереть в капле физиологического раствора до получения гомогенной суспензии. Полученный образец использовать по п. 9.2.

9.2. К исследуемому образцу механическим дозатором нанести на предметное стекло 0,015 мл специфического латексного теста (флакон № 1) и оба компонента осторожно перемешать стеклянной палочкой до получения гомогенной суспензии. Реакционную смесь на стекле инкубировать при комнатной температуре 4 минуты, периодически покачивая, а затем регистрировать результаты реакции.

9.3. Проверка качества контрольного теста. На предметное стекло нанести 20 мкл физиологического раствора, стеклянной палочкой снять часть колонии тестируемого штамма (исследуемый образец) и растереть в капле физиологического раствора до получения гомогенной суспензии.

К 0,02 мл исследуемого образца, нанесенного на предметное стекло, добавить 0,015 мл контрольного теста (флакон № 2) и оба компонента осторожно перемешать стеклянной палочкой до получения гомогенной суспензии. Реакционную смесь на стекле инкубировать при комнатной температуре 4 минуты, периодически покачивая, а затем регистрировать результаты реакции.

9.4. Контроль специфичности латексного теста.

К 0,02 мл позитивного контроля (флакон № 3), нанесенного на предметное стекло, добавить 0,015 мл специфичного латексного теста (флакон № 1) и оба компонента осторожно перемешать стеклянной палочкой до получения гомогенной суспензии. Реакционную смесь на стекле инкубировать при комнатной температуре 4 минуты, периодически покачивая, а затем регистрировать результаты реакции.

10. Регистрация и учет результатов

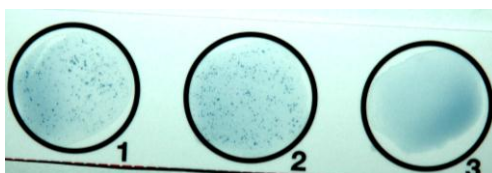
Учет результатов по п. 9.1, 9.2, 9.3, 9.4 провести через 4 минуты, руководствуясь таблицей и иллюстрацией.

Таблица 1 – Интерпретация результата

Положительный результат	Наличие видимой четкой окрашенной агглютинации частиц при добавлении к исследуемому образцу специфического латексного теста (флаконт 1). Наличие видимой четкой окрашенной агглютинации частиц при добавлении к позитивному контролю (флаконт 3) специфического латексного теста (флаконт 1). Отсутствие агглютинации, фон равномерно мутный при добавлении к исследуемому образцу контрольного теста (флаконт 2).
Отрицательный результат	Отсутствие агглютинации, фон равномерно мутный при добавлении к исследуемому образцу специфического латексного теста (флаконт 1). Наличие видимой четкой окрашенной агглютинации частиц при добавлении к позитивному контролю (флаконт 3) специфического латексного теста (флаконт 1).
Тест не работает	Отсутствие агглютинации, фон равномерно мутный при добавлении к позитивному контролю (флаконт 3) специфического латексного теста (флаконт 1).

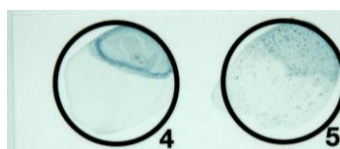
Иллюстрации к таблице интерпретации результатов:

Положительный результат



Исследуемый образец +	Позитивный контроль фл.№3	Исследуемый образец +
Специфический Латексный тест фл.№1	+ Латексный тест фл.№1	Контрольный тест фл.№2

Отрицательный результат



Исследуемый образец +	Позитивный контроль фл.№3
Сп.латексный тест фл.№1	+ Сп.латексный тест фл.№1

11. Срок годности.

Срок годности набора реагентов – 1 год со дня изготовления.

12. Условия хранения и эксплуатации латексной тест-системы

Диагностический набор реагентов «Латексная тест-система *E. coli* O104:H4» необходимо хранить в герметично закрытых флаконах в сухом защищенном от света месте при температуре 2-8 °С.

Допускается транспортировка набора реагентов «Латексная тест-система *E. coli* O157:H7» при температуре 2-30 °С в срок не более 10 суток.

Примечание – Не замораживать.

После вскрытия флаконов, латексную тест-систему можно использовать в течение срока годности при соблюдении условий хранения.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества «Латексной тест-системы *E. coli* O104:H4» в течение срока годности, следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Оболенск, Московская область, Серпуховский район, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. 8 (4967) 36-00-65, 36-01-16.