



LIAISON® EHEC Toxins (REF 318930)

Реагент для определения токсинов ЭГКП

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор LIAISON® EHEC Toxins – это набор для *in vitro* диагностики методом хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) для качественного определения шига-токсинов 1 и 2 в кале человека, бульонных культурах и культурах, культивированных на плотном агаре. Целью набора LIAISON® EHEC Toxins является диагностирование инфекций, вызываемых энтерогеморрагическими *E.coli* (ЭГКП). Для корректной постановки диагноза результаты анализа должны быть интерпретированы с учетом других клинических и лабораторных данных. Исследование должно проводиться на анализаторах линейки LIAISON®.

2. ВВЕДЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ТЕСТА

Энтерогеморрагические *E.coli* – это шига-продуцирующие *E.coli*, вызывающие серьезные инфекционные заболевания, такие как: гемолитический уремический синдром (ГУС) и геморрагические колиты. Серогруппа O157:H7 – наиболее часто встречаемая группа ЭГКП, ответственная за широко распространенные вспышки пищевых отравлений. Другие серогруппы, которые могут стать причинами серьезных заболеваний: O26, O103, O111, O121 и O145. Жвачные животные, такие как крупный рогатый скот и овцы, являются главными переносчиками шига-продуцирующих *E.coli* и

наиболее часто попадают в организм человека через пищу или воду, или путем прямого контакта с инфицированными животными или людьми⁽¹⁾.

Шига-токсины - бактериальные цитотоксины, продуцируемые *Shigella dysenteriae* первого типа и шига-продуцирующей *E.coli*. ЭГКП не только продуцируют шига-токсины, но также экспрессируют с гена *eae* адгезин интимин, который используется для прикрепления и уничтожения энтероцитов⁽²⁾. При пероральном заражении ЭГКП и последующем прохождении через желудок и тонкую кишку в ободочной кишке включаются гены вирулентности, а ЭГКП использует интимину адгезию к энтероцитам, вызывая стирание микроворсинок и диарею. Шига-токсин вызывает локальное повреждение кровеносных сосудов, и если достаточное количество шига-токсина всасывается в кровообращение, это может повлиять на почки и центральную нервную систему, что в конечном итоге вызывает гемолитический уремический синдром⁽²⁾.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод представляет собой 2-ступенчатый модифицированный «сэндвич» анализ для обнаружения обоих шига-токсинов 1 и 2. Для исследования используются моноклональные антитела для захвата обоих шига-токсинов и моноклональные антитела для детекции молекулы шига-токсина 1 и поликлональные антитела для детекции шига-токсина 2. Для исследования необходимо 200 мкл пробы, состоящей из разбавителя и культуры (культивированной в жидких или плотных питательных средах) или кала, который вначале инкубируется с антителами к шига-токсинам 1 и 2. Далее происходит инкубация пробы с парамагнитными частицами с адсорбированными на них антителами к обоим шига-токсинам. После второй инкубации несвязанный материал удаляется путём промывки. Затем добавляются запускающие реагенты и индуцируется хемилюминесцентная реакция. Интенсивность люминесценции измеряется с помощью фотоумножителя в относительных единицах интенсивности, которая пропорциональна концентрации шига-токсинов в калибраторах, контролях и пробах.

4. СОСТАВ

НАБОРА

Магнитные частицы (2,4 мл)	Магнитные частицы, покрытые моноклональными антителами к шига-токсину 1 и 2; фосфатный буфер; БСА; сурфактант, 0,1% Proclin® 300 и 0,05% сульфат гентамицина.
Конъюгат (3,0 мл)	Моноклональные антитела к шига-токсину 1, конъюгированные в производном изолюминола; поликлональные антитела к шига-токсину 2, конъюгированные к производному изолюминола; фосфатный буфер; БСА; сурфактант, 0,1% Proclin® 300 и 0,05% сульфат гентамицина.
Количество определений	100

ProClin® является зарегистрированным товарным знаком Dow и компаний аффилиатов Dow. Все реагенты готовы к использованию. Порядок реагентов отражает расположение контейнеров в Интеграле реагентов.

Помимо интегрального картриджа в состав набора входят:

Калибратор 1 (3 x 2 мл), лиофилизированный	Инактивированный шига-токсин, фосфатный буфер, БСА, сурфактант, 0,1% Proclin ® 300, 0,05% сульфат гентамицина. Разбавлять в 2 мл дистиллированной или деионизированной воды
Калибратор 2 (3 x 2 мл), лиофилизированный	Инактивированный шига-токсин, фосфатный буфер, БСА, сурфактант, 0,1% Proclin ® 300, 0,05% сульфат гентамицина. Разбавлять в 2 мл дистиллированной или деионизированной воды
Разбавитель (1 x 50 мл)	Сыворотка ламы, сыворотка морской свинки, 0,2% Proclin ® 300, 0,05% сульфат гентамицина После вскрытия разбавитель стабилен в течение 10 недель при температуре 2-8°C
Дозаторы (2 x 50)	Дозаторы для жидкого кала (кат.№ X0031)
Устройство для экстракции кала* (2 x50)	Полипропиленовая пробирка для перемешивания, коническая пробирка и голубая крышка, элемент с голубым фильтром из плотного полиэтилена.

* Устройство не содержит БФА, латекс или ДЭГФ.

Стандартизация: референсом для установки концентрации калибраторов служат внутренние стандарты компании

LIAISON® XL анализатор	LIAISON® анализатор
Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100)	Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100)
Мешки для отработанных реакционных модулей (каталожный номер X0025)	Мешки для отработанных реакционных модулей (каталожный номер 450003)
Кюветы (каталожный номер X0016)	Реакционные Модули (каталожный номер 319130)
Набор запускающих реагентов XL (каталожный номер 319200)	Набор запускающих реагентов (каталожный номер 319102) или Набор запускающих реагентов XL (каталожный номер 319200)
Одноразовые наконечники (REF X0015)	Набор растворов для обслуживания (каталожный номер 310990)
	Реактив для ежедневной проверки анализатора 12 (каталожный номер 319150)

Дополнительные материалы, рекомендованные для работы:

LIAISON® Контроль для токсинов ЭГКП (каталожный номер 318931)

Необязательные устройства, которые можно приобрести в компании DiaSorin:

Дозатор для жидкого кала (X0031)

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ


ТОЛЬКО ДЛЯ *IN VITRO* ДИАГНОСТИКИ - Не для внутреннего или внешнего использования в организме людей и животных.

Общие правила безопасности:

- Все образцы, реагенты и биологические материалы, используемые при постановке настоящего исследования, следует рассматривать как потенциально опасные, способные передавать инфекционные агенты. Избегайте попадания на кожу, глаза или слизистую оболочку. Следуйте санитарно-эпидемиологическим правилам и нормам при выполнении исследования.
- Запрещается принимать пищу и напитки, курить или пользоваться косметикой в помещении лаборатории.
- Запрещается пипетировать ртом.
- Избегайте прямого контакта с потенциально инфицированным биологическим материалом. Не забывайте одевать халат, защитные очки и перчатки.
- Тщательно мойте руки после работы.
- Избегайте разбрызгивания или образования аэрозолей при работе с реагентами. В случае разбрызгивания реагентов, дезактивируйте их 10% раствором отбеливателя (содержащий 0,5% раствор гипохлорита натрия) и утилизируйте как потенциально опасные.
- Необходимо утилизировать отходы в соответствии с местными требованиями санитарно-эпидемиологического и экологического контролей страны.
- Не используйте наборы или реагенты с истекшим сроком годности.

Информация об опасности и безопасности химических веществ: Реагенты в данном наборе классифицированы в соответствии со стандартом безопасности США OSHA; отдельным законам США о праве на информацию; Регламенту Канадского центра по гигиене труда и технике безопасности; и применимые директивы Европейского Союза (см. Паспорт безопасности материала для дополнительной информации).

GHS/CLP:

	ProClin®
Кат No.:	55965-84-9
Реагенты:	[SORB] [CONJ] [CAL 1] [CAL 2] [DIL SPE]
Классификация:	Кожная сенсibilизация, категории 1
Сигнальное слово:	Внимание
Пиктограмма:	 GHS07 – Восклицательный знак
Заявление об опасности:	H317 – Может вызывать аллергическую реакцию
Предупредительные заявления:	P261 – Избегать вдыхания тумана или брызг. P272 – Загрязненная рабочая одежда не должна использоваться за пределами рабочего места. P280 – Носите защитные перчатки и одежду, а также защитные очки.

6. ПОДГОТОВКА ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ

Пожалуйста, обратите внимание на следующие важные меры предосторожности при работе с реагентами:

6.1 Ресуспендирование магнитных частиц

Магнитные частицы должны быть полностью ресуспендированы до того, как интеграл будет помещен в прибор. Чтобы обеспечить полное ресуспендирование частиц, выполните следующие действия:

- Перед удалением алюминиевых мембран с флаконов, проверните колесо флакона с магнитными частицами, пока цвет суспензии не станет равномерно коричневым. Аккуратно перемешайте их содержимое, держа интеграл горизонтально, чтобы избежать пенообразования. Осмотрите нижнюю часть флакона, чтобы убедиться, что все магнитные частицы были ресуспендированы.
- При необходимости повторите процедуру до полного ресуспендирования магнитных частиц.
- После удаления алюминиевой мембраны тщательно протрите поверхность каждого флакона для удаления остатков жидкости, если необходимо.

6.2 Вспенивание реагентов

Чтобы обеспечить оптимальные рабочие характеристики интеграла, следует избегать пенообразования реагентов.

Придерживайтесь приведенных ниже рекомендаций по предотвращению вспенивания:

- Перед использованием интеграла осмотрите реагенты, чтобы убедиться в отсутствии пены. Если после ресуспендирования магнитных частиц пена появилась, поместите интеграл в анализатор и подождите, пока пена исчезнет. Интеграл готов к использованию только тогда, когда пена исчезла, а интеграл с ресуспендированными частицами находится на борту.

6.3 Установка интеграла в область загрузки реактивов

Анализатор LIAISON®

- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 30 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

Анализатор LIAISON® XL

- Анализатор LIAISON® XL оснащен встроенным твердотельным магнитным устройством, которое помогает ресуспендировать микрочастицы до размещения интеграла с реагентами в области загрузки реактивов анализатора. Для уточнения деталей обратитесь к руководству по эксплуатации анализатора.
 - а. Вставьте интеграл с реагентами в специальный разъем.
 - б. Оставьте интеграл с реагентами в твердотельном магнитном устройстве, по крайней мере, на 30 секунд (допускается до нескольких минут). Повторите по мере необходимости.
- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 15 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

7. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ

После получения Интегральный реагент должен храниться в вертикальном положении, чтобы облегчить повторное ресуспендирование магнитных частиц. Когда реагентный интеграл хранится в нераспечатанном виде, реагенты стабильны при 2-8 ° С до истечения срока годности.

Запрещается замораживать реактивы, входящие в состав картриджа. После вскрытия интегралы могут быть возвращены в коробку с набором и храниться в вертикальном положении при 2-8 ° С или храниться в анализаторе. При правильном хранении интегралы имеют срок использования 8 недель. Обратитесь к разделу 11 за интервалами калибровки.

8. ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Кал необходимо собирать в чистый герметичный контейнер без консервантов или в транспортную среду Cary Blair. При температуре 2-8°C пробы стабильны в течение 48 часов. Допускается замораживание при температуре -20°C. При невозможности исследовать пробы в течение 48 часов (при температуре 2-8°C) или их замораживания, кал должен быть собран в специальную транспортную среду Cary Blair. Пробы в транспортной среде можно хранить в течение 72 часов при температуре 2-8°C. Допускается замораживание при температуре -20°C или -70°C. Перед использованием замороженные пробы необходимо нагреть до комнатной температуры и перемешать. Не допускается повторное замораживание проб. Бульонные культуры стабильны в течение 8 часов при температуре 18-25°C. Их можно хранить в течение 48 часов при температуре 2-8°C. Допускается замораживание при температуре -70°C. Замороженные культуры стабильны в течение 6 недель.

9. ХРАНЕНИЕ ЭКСТРАКТА

Экстракт кала или культуральный экстракт стабилен в течение 8 часов при комнатной температуре (18 - 25°C), 72 часа при температуре 2-8°C или в течение 6 недель при температуре -20°C. Не допускается повторное замораживание/размораживание экстракта более 2 раз.

При долгом хранении экстракта или его транспортировке необходимо удалить из него видимый дебрис, который осел на дне конической пробирки. В этом случае перенесите экстракт в другую пробирку, не смешивая его с дебрисом.

10. КАЛИБРОВКА УРОВЕНЬ 1 И 2

Калибраторы токсинов ЭГКП поставляются в лиофилизированном виде. Их необходимо ресуспендировать в 2 мл дистиллированной или деионизированной воды. После разведения оставьте флаконы при комнатной температуре в течение 5 минут, а затем аккуратно перемешайте в течение минимум 20 минут. Перенесите 900 мкл (три контроля) в стеклянную или пластиковую пробирку. Наклейте на пробирку соответствующий штрих-код, который входит в состав набора, и поместите в анализатор. Проведите процедуру калибровки согласно инструкции.

В случае невозможности выполнения процедуры сразу же после разбавления калибраторов, следует их аликвотировать (минимальный объем для аликвоты - 900 мкл) и заморозить при температуре -20°C. Замороженные аликвоты калибраторов стабильны в течение 4 недель. Калибраторы для данного исследования стабильны в течение 2 часов при комнатной температуре (18 - 25°C). Допускается 1 повторная заморозка калибраторов при температуре -20°C. Тщательно перемешайте калибраторы после цикла замораживания/оттаивания перед использованием.

Калибратор и Интегральный Реагент специфичны по номеру лота. Не используйте калибраторы и реагенты с разными лотами в одном исследовании.

11. КАЛИБРОВКА

Исследование калибраторов, входящих в состав интеграла, позволяет перекалибровать мастер-кривую, хранящуюся в памяти анализатора, с использованием значений концентрации калибраторов, зашифрованных в штрих-коде этикетки интеграла.

Калибровка должна быть проведена в трех повторах в следующих случаях:

- Используется новая серия набора реактивов или набора запускающих реактивов.
- Прошло более 12 дней с момента последней калибровки.
- Было проведено обслуживание анализатора.
- Результаты исследования контрольных сывороток выходят за пределы допустимого диапазона.

12. ПРОБОПОДГОТОВКА

Набор LIAISON® EHEC Toxins определяет шига-токсины 1 и 2 из нативного кала или кала, собранного в специальную транспортную среду Cary Blair, из культур, выращенных в бульоне MacConkey, бульоне для грамотрицательных бактерий или на плотных агарах. Пробоподготовка с использованием устройства для экстракции кала следующая:

Протокол для бульонной культуры

1. Добавьте 50 мкл кала в 5 мл бульона MacConkey или бульона для грамотрицательных бактерий. Перемешайте в течение 10 секунд.
2. Инкубируйте в течение 16-24 часов при температуре 37±1°C.

Использование устройство для экстракции кала:

3. Добавьте **350 мкл** разбавителя в пробирку для смешивания устройства для экстракции кала.
4. Аккуратно перемешайте питательную среду и добавьте **500 мкл** в пробирку для смешивания.
5. Плотно закрутите конический фильтр на пробирку для смешивания
6. Хорошо перемешайте на вортексте в течение 20 секунд.
7. Отцентрифугируйте содержимое на скорости $\geq 2000 \times g$ в течение 10 минут. Коническая пробирка при этом должна быть сверху устройства.
8. После центрифугирования переверните устройство для экстракции конической пробиркой вниз. Отцентрифугируйте содержимое конической пробирки при скорости $200 \times g$ в течение минуты. После центрифугирования не переворачивайте устройство, оно должно оставаться строго в вертикальном положении.
9. Открутите и утилизируйте пробирку для перемешивания и голубой фильтр.

* $g = (1118 \times 10^{-8})(\text{радиус в сантиметрах})(\text{число оборотов в минуту})$

10. Поместите коническую пробирку в штатив “S” и установите в анализатор. Условия хранения экстракта см. в пункте 9 настоящей инструкции.
11. Обработайте рабочую зону 10% раствором отбеливателя (0,5% раствором гипохлорита).

Протокол для нативного кала или кала, собранного в транспортную среду

1. Добавьте **750 мкл** разбавителя в пробирку для смешивания устройства для экстракции кала (LIAISON Stool Extraction Device).
2. Добавление кала: Перемешайте кал насколько это возможно для того, чтобы перенести пробу
 - а. **Жидкий или полужидкий стул:** Используя одноразовый дозатор жидкого стула, отмерьте и перенесите 750 мкл кала (можно использовать образцы кала или среду транспортировки Cary Blair) в смесительную пробирку LIAISON® для экстракции стула, содержащую разбавитель образца. При необходимости промойте пипетор несколько раз смесью суспензии для кала, чтобы убедиться, что максимальное количества образца было собрано из пипетора для жидкого кала.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если, в случае необходимости добавления 750 мкл жидкого или полужидкого кала, количество пробы недостаточно, можно разбавить пробу с разбавителем в соотношении 1:1. (Пример 400 мкл жидкой или полужидкой пробы к 400 мкл разбавителя).

б. **Твердый стул:** Используя лопатку устройства для экстракции кала (LIAISON Stool Extraction Device), которая находится на конце голубого конического фильтра, отмерьте и добавьте в пробирку для смешивания пробу диаметром 5 мм (размером с горошину) в пробирку для смешивания с 750 мкл разбавителя (LIAISON EHEC Toxins Sample Diluent). Необходимо визуально проверить лопатку после того, как будет проведена процедура перемешивания (4 этап), чтобы убедиться, что на ней не остались частички биологического материала. В противном случае снова закройте устройство, чтобы удалить частички кала с лопатки. При необходимости можно повторить данную процедуру. При очень твердом стуле допускается использование альтернативных приспособлений.

3. Плотно закрутите конический голубой фильтр на пробирке для смешивания.
4. Хорошо перемешайте содержимое пробирки примерно 20 секунд.
5. Отцентрифугируйте содержимое пробирки на скорости $\geq 2000 \times g$ в течение 10 минут. Коническая пробирка при этом должна быть сверху устройства.
6. После центрифугирования переверните устройство для экстракции конической пробиркой вниз. Отцентрифугируйте содержимое конической пробирки при скорости $200 \times g$ в течение минуты. После центрифугирования не переворачивайте устройство, **оно должно оставаться строго в вертикальном положении.**
7. Открутите и утилизируйте пробирку для перемешивания и голубой фильтр и утилизируйте как потенциально инфицированные отходы.
8. Проверьте жидкий супернатант в конической пробирке, он не должен содержать дебриса или пузырей.
9. Поместите коническую пробирку в штатив “S” и установите в анализатор. Условия хранения экстракта см. в пункте 9 настоящей инструкции.
10. Обработайте рабочую зону 10% раствором отбеливателя (0,5% раствором гипохлорита).

Протокол для культуры, выращенной на плотных питательных средах

1. Посейте 20 мкл на плотную питательную среду с помощью микробиологической петли.
2. Инкубируйте в течение 16-24 часов при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Используйте устройство для экстракции кала:

3. Добавьте **500 мкл** разбавителя в пробирку для смешивания устройства для экстракции кала.
4. Переместите колонии с помощью петли в пробирку для смешивания.
5. Плотно закрутите конический голубой фильтр на пробирке для смешивания.
6. Хорошо перемешайте содержимое пробирки примерно 20 секунд.
7. Отцентрифугируйте содержимое пробирки на скорости $\geq 2000 \times g$ в течение 10 минут. Коническая пробирка при этом должна быть сверху устройства.
8. После центрифугирования переверните устройство для экстракции конической пробиркой вниз. Отцентрифугируйте содержимое конической пробирки при скорости $200 \times g$ в течение минуты. После центрифугирования не переворачивайте устройство, оно должно оставаться строго в вертикальном положении.
9. Открутите и утилизируйте пробирку для перемешивания и голубой фильтр и утилизируйте как потенциально инфицированные отходы.
10. Поместите коническую пробирку в штатив “S” и установите в анализатор. Условия хранения экстракта см. в пункте 9 настоящей инструкции.
11. Обработайте рабочую зону 10% раствором отбеливателя (0,5% раствором гипохлорита).

В конце инструкции Вы найдете иллюстрированную схему использования приспособления для экстракции кала.

13. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Строгое следование рекомендациям инструкции пользователя гарантирует получение корректных результатов.

Анализатор LIAISON®. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в штрих-коде этикетки интеграла. Если информации со штрих-кода не считывается, то картридж является непригодным для использованию и должен быть утилизирован (см. Инструкцию пользователя).

Анализатор LIAISON® XL. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в радиочастотной метке интеграла. Если информации с радиочастотной метки не читается, то картридж является негодным к использованию и должен быть утилизирован (см. Инструкцию пользователя).

Операции постановки анализа имеют следующую последовательность:

1. Раскапывание калибраторов, контролей или проб в кюветы реакционного модуля

2. Добавление конъюгата
3. Инкубация
4. Добавление магнитных частиц в ячейки реакционного модуля.
5. Инкубация
6. Промывка Системной/Промывочной жидкостью
7. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности свечения.

На результаты иммуноанализа могут влиять колебания температуры. Пользователи должны знать об изменениях в своей лабораторной среде; может потребоваться более частое использование контролей и последующая калибровка.

14. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества должен выполняться один раз в день использования или в соответствии с руководящими принципами или требованиями местных нормативных актов или аккредитованных организаций. Пользователю рекомендуется обратиться к CLSI C24-A35 и 42 CFR 493.1256 (c) для получения инструкций по надлежащей практике контроля качества.

Контроль LIAISON EHEC Toxins Control Set (Кат. № 318931) предназначен для мониторинга правильности работы реагента. Контроль необходимо проводить в 1 повторности для проверки правильности работы реагента. Тестирование проведено успешно, если значения контроля входят в ожидаемый диапазон. Если результаты измерения контрольных сывороток выходят за допустимые пределы, необходимо повторно провести калибровку методики, а измерение контрольных материалов и образцов должно быть проведено повторно. Результаты тестирований образцов верны только при условии, что значения протестированных контролей входят в ожидаемый диапазон.

Перед использованием других контрольных материалов необходимо оценить возможность их использования с данным набором реактивов, после чего необходимо установить подходящие пределы допустимых значений.

Пределы допустимых значений каждого контроля обозначены в сертификате исследования и указывают границы, установленные компанией DiaSorin для контрольных значений, которые могут быть получены при выполнении исследования.

15. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализатор автоматически рассчитывает уровень шига-токсинов ЭГКП, результат выдается в значении индекса и далее результат оценивается. Подробная информация в инструкции пользователя.

Пороговое значение для набора LIAISON® EHEC Toxins определяется на основе результатов исследуемых проб в популяции пациентов с положительными и отрицательными значениями ЭГКП, продуцирующих шига-токсины.

Кал, культуры, выращенные на жидких и плотных питательных средах, исследовались в параллели с помощью наборов сторонних производителей и набора LIAISON® EHEC Toxins. Было выполнено кумулятивное распределение частот (ROC) исследования для определения оптимума порогового значения.

Было определено, что заданная величина составляет 1,0.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Если в результате отображается сообщение «invalid RLU» и предупреждающий (!) флаг, то результат не может считаться достоверным и необходимо повторить постановку исследования. Если при повторной постановке анализатор выдаст такое же сообщение, обратитесь в службу поддержки.

Результаты исследований должны быть интерпретированы следующим образом:

Индекс	Результат	Интерпретация
≤ 0,90	Отрицательный	Указывает на отсутствие шига-токсинов 1 и 2 (или их концентрации ниже предела обнаружения исследования).
> 0,90 и < 1,10	Неопределенный	Пробы с неопределённым результатом должны быть экстрагированы и исследованы повторно. Считаются положительными пробы, результат которых при повторном исследовании ≥1,10. Считаются отрицательными пробы, результат которых при повторном исследовании ≤0,90. Если результат пробы повторно определяется как неопределенный, следует повторить забор биологического материала с последующим его исследованием.
≥1,10	Положительный	Указывает на наличие шига-токсинов, продуцируемых ЭГКП.

16. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Результаты анализа должны использоваться в сочетании с другими клиническими и лабораторными данными, чтобы помочь клиницисту принимать индивидуальные решения по ведению пациентов.
2. Наличие навыков и прямое следование инструкции пользователя необходимы для получения точных результатов.
3. Шига-токсин 1 и токсин, продуцируемый *Shigella dysenteriae* 1 типа, схожи по структуре. Поэтому набор LIAISON® EHEC Toxins будет оценивать результат как положительный, при наличии в образцах кала шига-токсина, продуцируемого другими инфекционными организмами.
4. Набор LIAISON® EHEC Toxins не оценивался в педиатрической популяции.
5. Не могут быть использованы образцы кала, стабилизированные в 10% формалине, соединения формалина и мертиолята, ацетат натрия и формалина, или поливиниловый спирт.
6. Интегралы не могут переноситься между анализаторами LIAISON® и LIAISON®XL. После распознавания

реагентного картриджа одним типом анализаторов, он должен использоваться там до конца.

- Из-за проблем прослеживаемости, вытекающих из вышеприведенного утверждения, последующие наблюдения пациентов могут не быть заключены между типами анализаторов. Это должно быть выполнено на одном конкретном типе анализатора (LIAISON® или LIAISON®XL).

17. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Набор LIAISON® EHEC Toxins определяет наличие шига-токсина. В соответствии с общепринятой лабораторной практикой каждая лаборатория должна установить собственные референсные значения, отражающие их типовую популяцию. В качестве ориентировочных значений можно использовать приведенные ниже данные.

Заболевания, вызываемые *Escherichia coli*, продуцирующей шига-токсин, варьируются от самокупирующей диареи до геморрагических колитов и гемолитического уремического синдрома (ГУС). Серотип O157:H7 является наиболее частой причиной геморрагических колитов и ГУС и обнаруживается как во время вспышек пищевых отравлений, так и в спорадических случаях⁽³⁾.

Согласно опубликованным в 2011 году оценочным данным, был идентифицирован 31 возбудитель. Ежегодно они становятся причиной 9,4 миллионов пищевых отравлений в США, из которых 3,6 миллионов вызваны именно бактериальными патогенами, а порядка 63150 заболеваний - серогруппой O157. Примерно у 6-8% пациентов (15% из которых дети младше 5 лет) с выявленной серогруппой O157 развился ГУС⁽⁴⁾.

В 1997 году было проведено исследование 30000 образцов кала пациентов, страдающих диареей. Выяснилось, что серотип O157:H7 *Escherichia coli* – четвертый из наиболее распространенных бактериальный энтерических патогенов.

Исследования, проводимые в Европе, показали, что распространенность шига-продуцирующей *Escherichia coli* в пробах от пациентов с диареей составляет 0,3-9,3%, распространенность серогруппы O157 - 0 - 2,7%⁽³⁾.

18. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

18.1 Сравнение

Было исследовано 214 культур, выращенных в жидкой питательной среде MacConkey, с помощью набора LIAISON® EHEC Toxins и другого коммерческого набора для ЭГКП. Результаты приведены в таблице ниже:

LIAISON® EHEC Toxins	ЭГКП сравнительным ИФА методом		
	Положительный	Отрицательный	Всего
Положительный	89	0	89
Сомнительный	1	3	4
Отрицательный	2	119	121
Всего	92	122	214

Совпадение по положительным результатам = (89/92) 96,7% 95%CI (90,9%-98,8%)

Совпадение по отрицательным результатам = (119/122) 97,5% 95%CI (93,0%-99,1%) Общее

совпадение = (208/214) 97,2% 95%CI (94,0%-98,7%)

Было исследовано 214 культур, выращенных в бульоне для грамотрицательных бактерий, набором LIAISON® EHEC Toxins Assay и другим коммерческим набором для ЭГКП. Результаты приведены в таблице ниже:

LIAISON® EHEC Toxins	ЭГКП сравнительным ИФА методом		
	Положительный	Отрицательный	Всего
Положительный	76	5	81
Сомнительный	1	0	1
Отрицательный	1	131	132
Всего	78	136	214

Совпадение по положительным результатам = (76/78) 97,4% 95%CI(91,2%-99,2%)

Совпадение по отрицательным результатам = (131/136) 96,3% 95%CI(91,7%-98,4%)

Общее совпадение = (207/214) 96,7% 95%CI(93,4%-98,4%)

Было исследовано 214 образцов кала набором LIAISON® EHEC Toxins Assay и другим коммерческим набором для ЭГКП. Результаты приведены в таблице ниже. Положительные пробы кала состояли из 17 клинических образцов и 84 проб культур штаммов ЭГКП, полученных из образцов кала пациентов, страдающих диареей.

LIAISON® EHEC Toxins	ЭГКП сравнительным ИФА методом		
	Положительный	Отрицательный	Всего
Положительный	93	0	93
Сомнительный	0	1	1
Отрицательный	2	118	120
Всего	*95	119	214

Совпадение по положительным результатам = (93/95) 97,9% 95%CI(92,7%-99,4%)

Совпадение по отрицательным результатам = (118/119) 99,2% 95%CI(95,4%-99,8%)

Общее совпадение = (211/214) 98,6% 95%CI(96,0%-99,5%)

*ПРИМЕЧАНИЕ: Сравнительный набор выявил 101 пробу кала с положительными результатами, но 6 проб культур, выращенных в жидком бульоне MacConkey и бульоне для грамотрицательных бактерий, оказались с отрицательными показателями.

18.2 Точность

В течение 12 дней в дубле были исследованы 2 набора контролей и 6 разбавленных проб кала с использованием наборов LIAISON® EHEC Toxins Assay одного лота на анализаторе LIAISON®. Пробы были разделены по следующим

уровням: 2 отрицательные, 1 с пограничными значениями, 3 положительные и 1 проба. Исследование проводилось согласно требованиям EP5-A2 Института клинических и лабораторных стандартов.⁶

Сходимость

Проба	Отр контроль	Полож контроль	1	2	3	4	5	6
Количество определений	48	48	48	48	48	48	48	48
Значения (Индекс)	0,27	5,05	0,62	0,84	0,99	19,37	2,37	4,13
Стандартное отклонение (Индекс)	0,01	0,31	0,02	0,03	0,03	1,64	0,12	0,16
Коэффициент вариации (%CV)	3,5	6,1	3,2	3,2	3,1	8,5	5,1	3,9

Воспроизводимость

Проба	Отр контроль	Полож контроль	1	2	3	4	5	6
Количество определений	48	48	48	48	48	48	48	48
Значения (Индекс)	0,27	5,05	0,62	0,84	0,99	19,37	2,37	4,13
Стандартное отклонение (Индекс)	0,02	0,47	0,04	0,06	0,06	2,55	0,22	0,24
Коэффициент вариации (%CV)	7,8	9,3	5,7	6,6	6,4	13,2	9,1	5,7

Для определения сходимости и воспроизводимости набора были подготовлены экстракты из двух проб, содержащих шига-токсин 1, и двух проб, содержащих шига-токсин 2, и исследованы с использованием набора LIAISON® EHEC Toxins Assay в течение 12 дней в дубли разными специалистами на анализаторе LIAISON® с использованием реагентов одного лота. Исследование проводилось согласно требованиям EP5-A2 Института клинических и лабораторных стандартов.⁽⁶⁾

Сходимость

Проба	1	2	3	4
Количество определений	48	48	48	48
Значения (Индекс)	8,20	2,66	8,96	2,61
Стандартное отклонение (Индекс)	0,42	0,15	0,88	0,13
Коэффициент вариации (%CV)	5,1	5,6	9,9	4,9

Воспроизводимость

Проба	1	2	3	4
Количество определений	48	48	48	48
Значения (Индекс)	8,20	2,66	8,96	2,61
Стандартное отклонение (Индекс)	0,64	0,21	1,16	0,18
Коэффициент вариации (%CV)	7,8	7,7	12,9	6,9

Анализатор LIAISON® XL: 2 контрольных набора и 6 образцов на основе буфера с шигитоксином были подготовлены и испытаны в DiaSorin Inc. два раза в день в двух экземплярах, в течение 12 рабочих дней на 1 анализаторе LIAISON® XL, причем 2 специалиста использовали одну партию реагентов для определения повторяемости и воспроизводимости анализа токсинов LIAISON® EHEC. Образцы готовили до следующих уровней: 2 отрицательных, 1 отрезанный образец и 3 положительных. Тестирование проводилось в соответствии с CLSI EP5-A26.

Сходимость

Проба	Отр контроль	Полож контроль	1	2	3	4	5	6
Количество определений	48	48	48	48	48	48	48	48
Значения (Индекс)	0,36	4,71	0,70	0,95	0,99	13,99	1,42	6,08
Стандартное отклонение (Индекс)	0,02	0,08	0,03	0,02	0,02	0,23	0,03	0,15
Коэффициент вариации (%CV)	5,3	1,6	4,1	2,5	1,8	1,6	2,4	2,5

Воспроизводимость

Проба	Отр контроль	Полож контроль	1	2	3	4	5	6
Количество определений	48	48	48	48	48	48	48	48
Значения (Индекс)	0,36	4,71	0,7	0,95	0,99	13,99	1,42	6,08

Стандартное отклонение (Индекс)	0,03	0,23	0,05	0,07	0,07	0,61	0,08	0,25
Коэффициент вариации (%CV)	6,9	4,9	7,0	7,0	6,6	4,4	5,4	4,1

Для определения сходимости и воспроизводимости набора были подготовлены экстракты из двух проб, содержащих шига-токсин 1, и двух проб, содержащих шига-токсин 2, и исследованы с использованием набора LIAISON® EHEC Toxins Assay в течение 12 дней в дубли разными специалистами на анализаторе LIAISON® XL с использованием реагентов одного лота. Исследование проводилось согласно требованиям EP5-A2 Института клинических и лабораторных стандартов.⁽⁶⁾

Сходимость

Проба	1	2	3	4
Количество определений	48	48	48	48
Значения (Индекс)	2,42	5,37	2,93	9,59
Стандартное отклонение (Индекс)	0,07	0,46	0,04	0,15
Коэффициент вариации (%CV)	2,9	8,5	1,4	1,5

Воспроизводимость

Проба	1	2	3	4
Количество определений	48	48	48	48
Значения (Индекс)	2,42	5,37	2,93	9,59
Стандартное отклонение (Индекс)	0,19	0,60	0,12	0,38
Коэффициент вариации (%CV)	8,0	11,2	4,1	4,0

18.3 Предел обнаружения

Согласно EP12-A2⁽⁷⁾ предел обнаружения шига-токсина 1 для набора составляет 5,0 нг/мл и 0,5 нг/мл для шига-токсина 2.

18.4 Интерференция

Проведенные исследования с веществами, которые могут вызывать интерференцию, показали ее отсутствие в пробах со слабо-положительными и отрицательными уровнями шига-токсинов 1 и 2 в указанных ниже концентрациях.

Вещество	Концентрация
Гемоглобин	3,2 мг/мл
Кровь	25%
Белые кровяные тельца	5%
Сульфат бария	5,0 мг/мл
Стеариновая кислота	2,65 мг/мл
Пальмитиновая кислота	1,3 мг/мл
Муцин	3,33 мг/мл
Метронидазол	12,5 мг/мл
Гидрохлорид ванкомицина	2,5 мг/мл
Имодиум	6,67 x 10 ⁻³ мг/мл
Висмут субсалицилат	0,87 мг/мл
Пепто бисмол	0,87 мг/мл
Прилосек	0,5 мг/мл
Gas-X	0,625 мг/мл
Тамс	0,5 мг/мл
Тагамет	0,5 мг/мл
Маалокс	4,2 мг/мл
Миралакс	79,05 мг/мл
Полиэтилен гликоль 4600	79,05 мг/мл

18.5 Перекрестная реактивность

Была исследована перекрестная реактивность набора LIAISON® EHEC Toxins Assay с нижеуказанными микроорганизмами. Данные микроорганизмы были добавлены в образцы со слабоположительными или отрицательными уровнями шига-токсинов 1 и 2 и исследованы с помощью набора LIAISON® EHEC Toxins Assay. Единственный микроорганизм, вызывающий перекрестную реактивность – *Shigella dysenteriae*, штамм ATCC 13313. Шига-токсин 1 и токсин, продуцируемый *Shigella dysenteriae* первого типа, схожи по структуре.

Все нижеперечисленные микроорганизмы не продемонстрировали интерференцию в образцах кала.

Микроорганизмы (в алфавитном порядке)	Конечные концентрации	Микроорганизмы (в алфавитном порядке)	Конечные концентрации
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Prevotella bivia</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Campylobacter coli</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Proteus vulgaris</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Campylobacter fetus</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Campylobacter jejuni</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Providencia stuartii</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Campylobacter lari</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Candida albicans</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Citrobacter freundii</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Salmonella group B</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Clostridium difficile</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Salmonella group C</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Clostridium perfringens Type B</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Salmonella group D</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Clostridium perfringens Type D</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Salmonella group E</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Clostridium sordellii</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Salmonella group N</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Salmonella Minnesota</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Enterobacter faecalis</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Shigella boydii</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Shigella flexneri</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43888	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Shigella sonnei</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Escherichia fergusonii</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Escherichia hermannii</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Staphylococcus aureus (Cowan)</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Helicobacter pylori</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Klebsiella pneumonia</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	<i>Yersinia enterocolitica O:9</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	Adenovirus Type 40	1 x 10 ^{5,29} ДИКТ50/мл
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	Adenovirus Type 41	1 x 10 ^{5,53} ДИКТ50/мл
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	Coxsackievirus	1 x 10 ^{5,06} ДИКТ50/мл
<i>Nocardia farcinica</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	Echovirus	1 x 10 ^{5,29} ДИКТ50/мл
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл	Rotavirus	1 x 10 ^{5,06} ДИКТ50/мл
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2,4 x 10 ⁸ КОЕ/мл		

18.6 Реакционная способность штаммов

Была исследована реакционная способность 48 нижеуказанных штаммов шига-продуцирующей *E. coli* с помощью набора LIAISON® EHEC Toxins Assay с использованием культур, выращенных в жидкой питательной среде MacConkey и на плотных питательных средах, по вышеуказанным протоколам. Результаты для каждого штамма оказались положительными. Число в скобках указывает на число исследованных в группе штаммов.

Тип штамма	Тип шига-токсина
O157:H7 (3)	1
O157:H7 (6)	2
O157:H7 (10)	1&2
O157:NM (1)	1
O157:NM (1)	2
O26:H11 (2)	1
O26:H11 (1)	1&2
O26:NM (1)	2
O103:H2 (1)	1
O103:H25 (1)	1
O111:H8 (1)	1
O111:H8 (1)	1&2
O111:NM (1)	1
O111:NM (2)	1&2
O121:H19 (2)	2
O121:H19 (1)	1&2
O121:H7 (1)	1
O145:H28 (1)	2
O145:NM (1)	1
O145:NM (1)	1&2
O45:H2 (1)	1
O45:NM (1)	1
O91:H21 (1)	2

O146:H21 (1)	1
O113:H21 (1)	2
O104:H4 (1)	2
O5:NM (3)	1

18.7 Контаминация

Были проведены исследования для определения вероятности контаминации при выполнении данного исследования. Полученные результаты показали, что изменений в значениях не наблюдалось, результаты демонстрировали отсутствие контаминации в пробах при использовании набора LIAISON® EHEC Toxins Assay, выполненного на анализаторе LIAISON®.

18.8 Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдался для шига-токсинов 1 и 2 до концентрации 2 000 нг/мл.

1. LIAISON® EHEC Toxins Пробоподготовка с использованием устройства для экстракции кала



Добавьте Разбавитель в пробирку для смешивания:

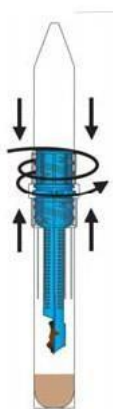
- 1) 350 мкл для жидкой среды
- 2) 750 мкл для кала
- 3) 500 мкл для культуры



Добавьте пробу: используя дозатор, голубую лопатку с голубым фильтром на конце конической пробирки или похожее устройство.

- 1) 500 мкл жидкой среды
- 2) 750 мкл жидкого или полужидкого кала
- 3) Твердый кал диаметром 5 мм
- 4) Культуру, выращенную на плотных питательных средах

2. Сборка устройства



ПЛОТНО закрутите элемент с голубым фильтром на пробирку для смешивания. Наружные кромки каждого элемента должны плотно прилегать друг к другу
ПРИМЕЧАНИЕ: Если устройство собрано верно, не должно быть прорезей



Устройство собрано правильно:
Нет прорезей



Устройство собрано неправильно:
Видна прорезь между элементами

3. Перемешивание



Перемешайте содержимое в течение 20 секунд на вортексе.

4. Центрифугирование



Отцентрифугируйте содержимое на скорости ≥ 2000 об/мин в течение 10 минут. Устройство должно быть помещено в центрифугу конической пробиркой вверх



Проверните устройство конической пробиркой вниз. Отцентрифугируйте на скорости ≤ 200 об/мин в течение 1 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ После этого устройство должно находиться строго в вертикальном положении.

5. Проведение исследования



Откройте коническую пробирку от устройства. Утилизируйте пробирку для перемешивания и голубой фильтр. Проверьте супернатант. Он может быть мутным, но в нем не должно быть дебриса или пузырей.

Поместите коническую пробирку в анализатор для исследования или прочтите раздел 9, где Вы найдете рекомендации по хранению экстракта. Обработайте рабочую зону 5% гпх.



Биологическая опасность
Одноразовое устройство