



Anti-Coli

Reactivi de testare pentru aglutinare pe lamă

INFORMAȚII PENTRU UZ PROFESIONAL



Utilizare preconizată

Reactivii de testare sunt utilizați pentru identificarea serovarului de tulpini de *E. coli* izolate din materialul de testat de origine umană sau alte origini prin aglutinare pe lamă și reacția Widal (test de confirmare).

Principiul testului

Dacă tulpina de *E. coli* conține un antigen acoperit de specificitatea reactivului de testat, acest antigen se leagă atunci când este amestecat cu anticorpul specific. Reacția antigen-anticorp are ca rezultat aglutinarea clar vizibilă a tulpinii.

Compoziție

Reactivii de testare sunt seruri absorbite de iepuri imunizați, un amestec de seruri absorbite de iepuri imunizați și anticorpi monoclonali sau conțin doar anticorpi monoclonali.

Conservant: azidă de sodiu (NaN_3) 0,9 mg/ml

Specificități polispecifice disponibile

Denumire	Conțin anticorpi împotriva
Anti-Coli I	O 26:K 60; O 44:K 74; O 114:K 90; O 125:K 70; O 142:K 86; O 158:K -
Anti-Coli II	O 55:K 59; O 86:K 61; O 91:K -; O 111:K 58; O 119:K 69; O 126:K 71; O 127:K 63; O 128:K 67
Anti-Coli III	O 25:K 11; O 78:K 80; O 103:K -; O 118:K -; O 124:K 72; O 145:K -; O 157:K -; O 164:K -

Specificități monospecifice disponibile

Denumire	Denumire	Denumire	Denumire
Anti-Coli O 25:K 11	Anti-Coli O 91:K -	Anti-Coli O 124:K 72	Anti-Coli O 145:K -
Anti-Coli O 26:K 60	Anti-Coli O 103:K -	Anti-Coli O 125:K 70	Anti-Coli O 157:K -
Anti-Coli O 44:K 74	Anti-Coli O 111:K 58	Anti-Coli O 126:K 71	Anti-Coli O 158:K -
Anti-Coli O 55:K 59	Anti-Coli O 114:K 90	Anti-Coli O 127:K 63	Anti-Coli O 164:K -
Anti-Coli O 78:K 80	Anti-Coli O 118:K -	Anti-Coli O 128:K 67	
Anti-Coli O 86:K 61	Anti-Coli O 119:K 69	Anti-Coli O 142:K 86	

Reactivii de testare polispecifici sunt liofilizați și trebuie dizolvați în 1 ml sau 5 ml de apă distilată (cantitatea indicată pe etichetă) înainte de utilizare și închiși corespunzător folosind pipeta picurătoare inclusă. După rehidratare, reactivii sunt gata de utilizare.

Reactivii de testare monospecifici sunt liofilizați și vor fi rehidratați în 1 ml de apă distilată. Pentru aglutinarea pe lamă, reactivii de testare monospecifici rehidratați sunt gata de utilizare. Pentru testul Widal în tub sau în placă de microtitrare, reactivul de testare rehidratat este utilizat pentru a pregăti seria de diluții (vezi 2.1 și, respectiv, 2.2).

Mod de prezentare a produsului, termenul de valabilitate și condiții de depozitare

Dacă sunt păstrați nedeschși la 2...8 °C, aceștia pot fi utilizați până la data indicată pe etichetă. Odată deschși și rehidratați, aceștia vor fi închiși corespunzător folosind pipeta inclusă. Dacă sunt păstrați la 2...8 °C, produsele polispecifice pot fi utilizate timp de cel puțin 18 luni, iar produsele monospecifice timp de cel puțin 24 luni. A nu se utiliza după data indicată pe etichetă.

Reactivul de testare poate prezenta uneori turbiditate care nu este cauzată de microbi. O astfel de turbiditate nu afectează eficacitatea reactivului, iar acesta poate fi limpezit prin centrifugare sau filtrare.

Înainte de utilizare, reactivii de testare vor fi aduși la temperatura camerei (18...26 °C).

Avertismente și precauții

Reactivii de testare care conțin material biologic sub formă de ser de iepure vor fi tratați ca fiind potențial infecțioși și vor fi manipulați în consecință.

Întrucât anticorpii monoclonali sunt produși prin metode biotehnologice, riscul de contaminare cu agenți infecțioși este, practic, exclus. Deoarece aceștia conțin materiale de origine animală (ser fetal de vițel, stabilizator), reactivii trebuie tratați ca având potențial infecțios și vor fi manipulați în consecință.

Pentru că aceste materiale conțin azidă de sodiu, se va evita contactul cu pielea și mucoasele! În caz de contact, clătiți cu multă apă.

Deoarece efectuarea testului de aglutinare pe lamă implică lucrul cu materiale patogene native, vor fi respectate toate procedurile de protecție a muncii care se impun (risc de infecție)!

Materiale și echipamente care nu sunt furnizate

Apă distilată, soluție salină fiziologică (NaCl), lame de sticlă, baghete de agitare, recipiente pentru eliminarea materialului infecțios, eprubete sau plăci de microtitrare (forma U), pipete, vârfuri de pipetă, baie de apă, incubator.

Materialele și metodologia de testare

Materialul de testare este aplicat pe medii de cultură de diferite selectivități și este incubat timp de 16 - 20 de ore la 35...37 °C.

1. Aglutinare pe lamă

1.1. Produse polispecifice

Transferați pe o lamă cantități mici de masă bacteriană din 5-10 colonii suspecte de *E. coli* și amestecați-o pe fiecare cu o picătură de reactiv de testare (aproximativ 25 μl) astfel încât să rezulte o suspensie omogenă, ușor lăptoasă. Asigurați-vă că lama este amplasată pe o suprafață întunecată. Rezultatul se citește cu ochiul liber ținând lama în fața unei surse de lumină pe un fundal negru și balansând-o (înclinând-o înainte și înapoi). Mediile de cultură selective pot afecta aglutinabilitatea bacteriilor. Acest factor poate fi eliminat prin îndepărtarea bacteriilor din materialul de cultură de nutrienți sau agar-sânge

sau mediu Kligler. Pentru a controla aglutinarea spontană, în paralel va fi aplicat un control negativ folosind NaCl în locul reactivului de testare.

Interpretarea rezultatelor testului

Testul poate fi evaluat numai în cazul în care controlul negativ rămâne opac lăptos.

Pozitiv: aglutinare vizibilă după ce proba a fost înclinată înainte și înapoi de mai puțin de 20 de ori. Într-o reacție puternic pozitivă (PR), aglutinarea (floculentă grosieră sau fină) apare imediat ce este amestecată masa bacteriană. Într-un rezultat slab pozitiv, aglutinarea apare numai după ce lama a fost înclinată înainte și înapoi de 10-20 de ori.



Negativ: dacă suspensia rămâne opacă lăptoasă sau reacția începe să apară numai după ce lama a fost înclinată înainte și înapoi de mai mult de 20 de ori, rezultatul este negativ (NR).



1.2. Produse monospecifice

Mai întâi, se prepară o subcultură din colonie pe un mediu neselectiv (nutrient sau agar sânge) care a prezentat o reacție pozitivă în testul descris la 1.1. Apoi, investigați materialul din această cultură așa cum este descris la punctul 1.1., folosind anticorpii monospecifici conținuți în reactivul de testare polispecific relevant. Rezultatul pozitiv va fi verificat în reacția Widal (testul de confirmare) descrisă mai jos pentru a exclude efectele oricăror aglutinări nespecifice paralele.

2. Reacția Widal (test de confirmare)

Clătiți bacteriile din subcultură cu soluție salină fiziologică (NaCl) și fierbeți timp de 1 oră, pentru a distruge antigenele K termolabile. Apoi ajustați suspensia de bacterii cu NaCl la o densitate de germeni de cca. 109 bacterii/ml (McFarland Standard 3) și utilizați-o ca suspensie de antigen.

2.1. Test cu tub Widal

Se prepară o serie de diluții ale reactivului de testare monospecific omolog în NaCl, progresând geometric cu un factor de 2 și începând cu o diluție de 1:25 (de exemplu, 50 μl reactiv de testare + 1,2 ml NaCl). Mai întâi, adăugați 0,5 ml NaCl în fiecare tub. Apoi, folosind o pipetă, adăugați 0,5 ml de reactiv de testare prediluat (1:25) în primul tub din seria de diluții descrescătoare (1:50).

Se amestecă bine și, cu ajutorul unei pipete, se transferă 0,5 ml din primul tub în al doilea tub. Procedați în mod analog până la ultimul tub din serie. La ultimul tub, după amestecare scoateți 0,5 ml și aruncați. Se adaugă 0,5 ml de suspensie de antigen ajustată în fiecare tub, ceea ce dă o diluție inițială a reactivului de testare de 1:100. Acoperiți tuburile și incubați în baie de apă sau incubator timp de 16-20 ore la 50 °C.

2.2. Test cu plăci de microtitrare Widal

Se prepară o serie de diluții ale reactivului de testare monospecific omolog în NaCl într-o placă de microtitrare marcată corespunzător (forma U). Seria de diluții ar trebui să progreseze geometric cu un

factor de 2, începând cu o diluție de 1:25. Mai întâi adăugați 50 µl NaCl în fiecare godeu dintr-o serie (godeuri A–H). Apoi adăugați 50 µl de reactiv de testare prediluat (1:25) în primul godeu. Se amestecă bine și, cu ajutorul unei pipete, se transferă 0,5 ml din primul godeu în al doilea godeu. Se amestecă bine și se transferă 50 µl în al treilea godeu, și așa mai departe. La ultimul godeu, după amestecare scoateți 50 µl și aruncați. Apoi adăugați 50 µl de suspensie de antigen la fiecare diluție de reactiv de testare, ceea ce dă o diluție inițială de 1:100. Se agită placa de microtitrare, se acoperă și se pune într-o cameră umedă, unde trebuie incubată timp de 16-20 ore la 50 °C.

2.3. Controale de calitate

2.3.1. Control pozitiv

Pentru a verifica dacă procedura de testare a fost respectată cu exactitate, va fi utilizată o tulpină de referință cu specificitate cunoscută. Este important ca tulpinile utilizate în acest scop să aibă antigenele bine exprimate pe suprafața celulei. Pentru controlul calității, se recomandă, așadar, utilizarea tulpinilor din teste de calitate inter-laboratoare sau a tulpinilor de origine definită care au fost complet caracterizate de un laborator extern.

2.3.2. Control negativ

Controale reactivi de testare. Utilizați NaCl în locul antigenului de testat drept substanță ce trebuie amestecată cu pre-diluția 1:25 a anticorpului monospecific.

Controale antigen Utilizați NaCl în locul reactivului de testare drept substanță ce trebuie amestecată cu suspensia de antigen de testat.

Controale soluție salină. Cu o pipetă, adăugați 1 ml (sau 100 µl) de soluție de NaCl într-un tub (sau într-un godeu).

Evaluarea testului în tub

Evaluați aglutinarea, de preferință folosind un aglutinoscop, după ce agitați ușor tubul. Reacția este pozitivă dacă pot fi detectate aglutinate clar vizibile. Într-o reacție negativă, fluidul din tuburi rămâne opac lăptos.

Evaluarea plăcii de microtitrare

Evaluați reacția din placa de microtitrare ținând-o în lumină. Într-o reacție pozitivă, aglutinații precipită sub formă de peliculă sau piele subțire. Reacția ar trebui, de asemenea, evaluată ca pozitivă dacă aglutinații au format deja un buton, dar acest buton este semnificativ mai mic în comparație cu controlul antigen și nu se scurge atunci când placa este ținută vertical. Într-o reacție negativă, antigenul se precipită pe fundul godeului sub forma unui buton care se scurge în formă de limbă atunci când placa este ținută vertical.

Interpretarea rezultatelor analizei

Atribuirea tulpinii testate la serotipul relevant este validată numai dacă tulpina testată aglutinează reactivul monospecific utilizat în test până la titrul O indicat pe eticheta flaconului (sunt permise abateri de ±1 unitate de titru). Controalele negative trebuie să nu prezinte nicio aglutinare.

Limitările metodei

Reactivii de testare reacționează cu tulpinile *E. coli* ce contin antigene de specificitatea enunțată în denumire. Există posibilitatea unor reacții încrucișate cu alte antigene de *E. coli* sau alte *Enterobacteriaceae*, din cauza antigenelor înrudite. Procedurile de aglutinare sunt considerate ca indicatoare orientative, dar nu furnizează și verificarea patogenității. Pentru alocarea fără echivoc a izolatelor de *E. coli* la grupurile patogene, trebuie să fie determinați factorii de virulență (R. Prager, H. Tschäpe, *Mikrobiologie* 17 (2007), 213–219).

Explicația simbolurilor utilizate



Cod lot



Data expirare: AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)



Număr catalog



Limitare temperatură



Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro



Consultați instrucțiunile de utilizare



Reactiv de testare



Aglutinare pe lamă



Reactiv de testare monoclonal



Liofilizat



Titru-O



Test în tub

Data revizuirii: 10/09/2019