sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 927 030-0 | F: +49 30 927 030-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

Anti-Coli

Testreagens for agglutinasjon på objektglass (slideagglutinasjon)

INFORMASJON FOR FAGPERSONELL

CE IVD

no

Tilsiktet bruk
Testreagensene er beregnet for serologisk påvisning og bestemmelse av *E. coli*-serotype, for stammer isolert fra prøvematerialer av human eller annen opprinnelse, ved hjelp av slideagglutinasjon eller Widals reaksjon (konfirmasjonstest).

Testprinsipp
Dersom *E. coli*-stammen har et antigen som dekkes av testreagenset, så vil dette antigenet bli bundet når det blandes med det spesifikke antistoffet. Stammens antigen-antistoff-reaksjon resulterer i klart synlig agglutinasjon.

Sammensetning
Testreagens er absorbert serum fra immuniserte kaniner, en blanding av absorberte sera fra immuniserte kaniner og monoklonale antistoffer, eller kun monoklonalt antistoff.
Konserveringsmiddel: natriumazid (NaN_3) 0,9 mg/ml

Tilgjengelige polyspesifikke spesifisiteter

Navn	inneholder antistoff mot
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 -

Tilgjengelige monospesifikke spesifisiteter

Navn	Navn	Navn	Navn
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	

De polyspesifikke testreagensene er lyofiliserte (frysetørrede) og må før bruk løses i enten 1 ml eller 5 ml destillert vann (den mengde som er angitt på etiketten) for deretter å lukkes skikkelig med medfølgende dråpetellerkork. Etter rehydrering er testreagensene **bruksklare**.
De monospesifikke testreagensene er lyofiliserte og må løses i 1 ml destillert vann. De rehydrerte monospesifikke testreagensene er **bruksklare** for slideagglutinasjon. For Widals reaksjon, utført enten i prøverør eller på mikrotiterplater, benyttes det rehydrerte testreagenset til å lage fortynningsseriene (se hhv. punkt 2.1 og 2.2).

Produktets form ved levering, holdbarhet og lagringsbetingelser
Dersom testreagensene oppbevares uåpnet ved 2...8 °C, kan de brukes frem til den datoen som er angitt på etiketten. Etter at flasken er åpnet og rehydrert må den lukkes skikkelig med den medfølgende dråpetellerkorken. De polyspesifikke produktene kan deretter brukes i minst 18 måneder dersom de oppbevares ved 2...8 °C og de monospesifikke produktene i minst 24 måneder. De må imidlertid ikke brukes etter utløpsdatoen som er angitt på etiketten. Testreagenset kan noen ganger oppvise turbiditet som ikke skyldes mikrober. Dette har ingen innflytelse på/reduserer ikke testegenskapene, og serumet kan klarnes ved sentrifugering eller filtrering.
Før bruk må tesreagensene ha oppnådd romtemperatur (18...26 °C).

Advarsler og forholdsregler
Testreagenser som inneholder biologisk materiale i form av kaninserum bør betraktes som potensielt infeksiøse og håndteres deretter.
Den bioteknologiske fremstillingen av de monoklonale antistoffene innebærer at risikoen for kontaminasjon av infeksiøse agens så godt som utelukkes. Men fordi de inneholder animalsk materiale (føtalt kalveserum, stabilisator), bør de behandles som potensielt infeksiøse og håndteres deretter. Testseraene er biologisk materiale, som bør behandles som potensielt infeksiøse og håndteres deretter. Da produktene inneholder natriumazid, må kontakt med hud og slimhinner unngås. I tilfelle kontakt må det skylles med rikelig bruk av vann. Siden slideagglutinasjon innebærer arbeid med native patogene stoffer, må alle relevante beskyttelsesprosedyrer følges (infeksjonsrisiko)!

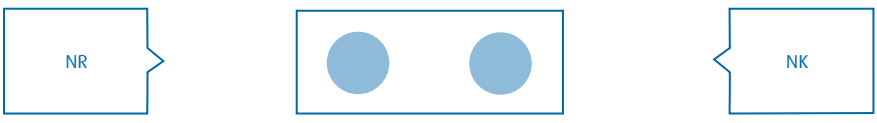
Materialer og utstyr som ikke medfølger
Destillert vann, fysiologisk saltvann (NaCl), objektglass, rørepinner, avfallsbeholder for infeksiøst materiale, prøverør og mikrotiterplater (U-bunn), pipetter, pipettespisser, vannbad, inkubator.

Prøvematerialer og metode
Prøvematerialet såes ut på ulike selektive dyrkningsmedier og inkuberes ved 35...37 °C i 16-20 timer.

1. Slideagglutinasjon
1.1. Polyspesifikke produkter
Overfør små mengder bakteriemasse, fortrinnsvis fra 5-10 suspekte *E. coli*-kolonier til et objektglass, og bland hver av dem med en dråpe testreagens (ca. 25 µl) slik at man får en homogen, melkeaktig suspensjon. Se til at objektglasset er plassert mot en mørk bakgrunn. Resultatet avleses visuelt ved å holde objektglasset foran en lyskilde mot en svart bakgrunn og vippe frem og tilbake. Selektive medier kan forstyrre bakteriens agglutinasjonsevne. Denne feilkilden kan elimineres ved å plukke bakterier fra næringsagar, blodagar, eller Kligler dyrkningsmedium. For å kontrollere for spontan agglutinasjon, må en negativ kontroll settes opp parallelt ved å benytte fysiologisk saltvann istedenfor testreagens.

Tolking av analyseresultat
Testen kan kun vurderes dersom den negative kontrollen (NK) forblir melkeaktig/ugjennomsiktig.
Positiv: Synlig agglutinasjon etter at prøven har blitt vippet frem og tilbake mindre enn 20 ganger. Sterke positive reaksjoner (PR) viser agglutinasjon (grovt eller finere flokkulert) så snart bakteriemassen tilsettes. Svake positive resultater viser agglutinasjon først etter at sliden har vært vippet frem og tilbake 10-20 ganger.

Negativ: Resultatet er negativt dersom suspensjonen forblir melkeaktig/ugjennomsiktig, eller dersom reaksjonen ikke opptrer før sliden har vært vippet frem og tilbake mer enn 20 ganger (NR).



1.2. Monospesifikke produkter
Lag først en renkultur av kolonien som ga positiv reaksjon i testen som er beskrevet i pkt. 1.1 på et ikke-selektivt medium (næringsagar eller blodagar). Undersøk deretter materiale fra denne kulturen slik det beskrives i pkt. 1.1 med bruk av de monoklonale antistoffene som er listet for det relevante polyspesifikke testreagenset. Et positivt resultat må kontrolleres med Widals reaksjon (konfirmeringstest), som beskrevet nedenfor, for å utelukke påvirkning fra mulig parallell uspesifikk agglutinasjon.

2. Widals reaksjon (konfirmeringstest)
For å ødelegge termolabile K-antigen, skylles bakteriene fra renkulturen med fysiologisk saltvann (NaCl) og kokes i en time. Fortynn bakteriesuspensjonen med NaCl til en kimtetthet på ca. 10^9 bakterier/ml (McFarland Standard 3). Bruk denne som antigensuspensjon.

2.1. Widals reaksjon i prøverør
Lag en fortynningsrekke av det homologe, monospesifikke testreagenset i NaCl. Fortynningsrekken skal øke geometrisk med en faktor på 2, begynnende med en 1:25 fortynning (dvs. 50 µl testreagens + 1,2 ml NaCl). Først tilsettes 0,5 ml NaCl til hvert av prøverørene. Ved bruk av pipette tilsettes så 0,5 ml av det forhåndsfortynnede (1:25) testreagenset til det første prøverøret i den avtagende fortynningsrekken (1:50). Bland godt og overfør ved hjelp av en pipette 0,5 ml fra det første røret til det andre røret. Fortsett på samme måte helt til siste prøverør i serien. Fra siste prøverør fjernes 0,5 ml etter blanding, og kastes. Tilsett så 0,5 ml av den justerte antigensuspensjonen til hvert prøverør. Dette gir en utgangs-fortynning av testreagenset på 1:100. Dekk til prøverørene, og inkuber i inkubator eller varmebad ved 50 °C i 16-20 timer.

2.2. Widals reaksjon på mikrotiterplate
Lag en fortynningsrekke av det homologe monospesifikke testreagenset i NaCl i en godt merket mikrotiterplate (U-bunn). Fortynningsrekken skal øke geometrisk med en faktor på 2, begynnende med en 1:25 fortynning. Tilsett først 50 µl NaCl til hver av brønnene i en fortynningsrekke (brønnene A-H). Tilsett så 50 µl av det forhåndsfortynnede (1:25) testreagenset til den første brønnen. Bland godt og overfør ved hjelp av en pipette 50 µl fra den første brønnen til den andre brønnen. Bland godt og overfør 50 µl til brønn nummer tre osv. Fra siste brønn fjernes 50 µl etter blanding, og kastes. Tilsett så 50 µl av antigensuspensjonen til hver testreagens-fortynning. Dette gir en utgangsfortynning på 1:100. Skak mikrotiterplaten, dekk til, og sett den i fuktekammer der den inkuberes ved 50 °C i 16-20 timer.

2.3. Kvalitetskontroller
2.3.1. Positiv kontroll
For å verifisere at testprosedyren ble fulgt nøyaktig, må en referansestamme med kjent spesifisitet benyttes. Derved er det viktig, at stammene som brukes for dette uttrykker sitt antigen godt på cellens overflate. Derfor anbefales det å bruke stammer fra koordinerte forsøk, eller eksterne karakteriserte feltstammer av definert opprinnelse til kvalitetskontroll.

2.3.2. Negativ kontroll
Testreagens kontroller Bruk NaCl i stedet for testantigen som den substans som skal blandes med den forhåndstillagde 1:25-fortynningen av monospesifikt antistoff.
Antigenkontroller Bruk NaCl i stedet for testreagens som den substans som skal blandes med testantigensuspensjonen.
Saltvannskontroller Tilsett 1 ml (eller 100 µl) NaCl-løsning i et prøverør (eller en mikrotiterplatebrønn) med en pipette.

Evaluering av Widals reaksjon i prøverør
Rist prøveføret lett, og vurder deretter agglutinasjonen, fortrinnsvis ved bruk av et agglutinoskop. Reaksjonen skal bedømmes som **positiv** dersom man ser klart synlige agglutinater. I en **negativ** reaksjon forblir væsken i prøverørene melkeaktig/ugjennomsiktig.

Evaluering av Widals reaksjon i mikrotiterplate
Reaksjonen i mikrotiterplaten bedømmes ved å holde platen mot lyset. Ved en positiv reaksjon vil agglutinatene felles ut i form av et flak eller som en tynn hinne. Reaksjonen skal også bedømmes som positiv dersom agglutinatene allerede har dannet en knapp, men denne knappen skal være signifikant mindre enn den som dannes i antigenkontrollen, og skal ikke renne når platen holdes vertikalt. Ved negative reaksjoner dannes et antigenpresipitat på bunnen av brønnen, formet som en knapp, men denne renner med tungeform når platen holdes vertikalt.

Tolkning av analyseresultatene
Serotypen til den testede stammen kan kun bestemmes dersom denne stammen agglutinerer med det monospesifikke reagenset som benyttes i testen opp til det O-titer som står angitt på flaskens etikett (avvik på ± 1 titertrinn tillates). Negative kontroller skal ikke oppvise agglutinasjon.

Metodens begrensninger
Testreagenset reagerer med *E.coli*-stammer som inneholder antigen med den angitte spesifisitet. Kryssreaksjon med andre *E.coli*-antigener eller med andre *Enterobacteriaceae* på grunn av beslektede antigen, er mulig. Agglutinasjonstester gjelder kun som henvisning, men ikke som påvisning av patogenitet. For entydig tilordning av *E. coli*-isolater til patogenetiske grupper, er bestemmelsen av virulensfaktorer nødvendig (R. Prager, H. Tschäpe, Mikrobiologie 17 (2007), 213-219).

Symbolforklaringer

LOT	LOT-nummer		Bruk før YYYY-MM (MM = slutten av måneden)
REF	Artikkelnummer		Temperaturgrenser
IVD	Medisinsk In vitro diagnostisk produkt		Se brukerveiledning
TR	Testreagens		Agglutinasjon på objektglass
mTR	Monoklonalt testreagens	LYO	Lyofilisert
MTP	Mikrotiterplatetest	TUBE	Test i reagensrør
O-TIT	O-titer		

Revisjonsdato: 21/07/2015