sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 700 144-0 | F: +49 30 700 144-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

Anti-Coli

Reagente de teste para a aglutinação em lâmina de microscópio

INFORMAÇÕES PARA UTILIZAÇÃO POR PROFISSIONAIS

CE IVD

pt

Utilização indicada
Os reagentes de teste servem como comprovante serológico bem como para a determinação da presença de serovar de estirpes isoladas de *E. coli* a partir de material de teste humano e de outras origens através da aglutinação em lâmina de microscópio e da reação de Widal (Teste de confirmação).

Princípio do teste
Se a estirpe de *E. coli* possuir um antigene correspondente do reagente de teste da área de cobertura, o mesmo fica ligado ao anticorpo específico aquando da mistura. No seguimento da reação entre antigene e anticorpo a estirpe fica visivelmente aglutinada.

Composição
Os reagentes de teste são soro imunológico absorvido de coelho, uma mistura de soro imunológico de coelho com anticorpos monoclonais ou contêm apenas anticorpos monoclonais.
Agentes de estabilização: Azida sódica (NaN_3) 0,9 mg/ml

Especificações poli-específicas disponíveis

Denominação	contém anticorpos contra
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 -

Especificações monoespecíficas disponíveis

Denominação	Denominação	Denominação	Denominação
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	

Os reagentes de teste poli-específicos são liofilizados e antes da utilização devem ser dissolvidos em 1 ou 5 ml de água destilada, de acordo com a quantidade declarada, e bem isolados com a pipeta em parafuso incluída. Após a reidratação, estão **prontos a serem utilizados**.
Os reagentes de teste monoespecíficos são liofilizados e devem ser reidratados em 1 ml de água destilada. Para a aglutinação em lâmina de microscópio, os reagentes de teste monoespecíficos dissolvidos estão **prontos a serem utilizados**. Para o teste em tubo de ensaio de Widal ou o teste de microplacas de titulação de Widal é produzida a sequência de diluição de reagente de teste reidratado (ver 2.1. ou 2.2.).

Conservação e condições de armazenagem
Os reagentes de teste vêm selados de origem e podem ser utilizados, se armazenados a uma temperatura entre 2...8 °C, até à data indicada na etiqueta. Após serem abertos pela primeira vez e dissolvidos, devem ser bem fechados juntamente com a pipeta incluída. Se armazenados entre 2...8 °C, os produtos poli-específicos podem ser utilizados pelo menos 18 meses, os monoespecíficos pelo menos 24 meses, mas no máximo até à data indicada na etiqueta. Ocasionalmente, podem ocorrer nos reagentes de teste turvações não provocadas por micróbios. Estas não comprometem a eficácia dos reagentes de teste e podem ser eliminadas por centrifugação ou filtragem.
Antes de serem utilizados, os reagentes de teste devem estar à temperatura ambiente (18...26 °C).

Advertências e medidas de segurança
Os reagentes de teste que contêm material biológico na forma de soro de coelho devem ser considerados como potencialmente infecciosos e manuseados em conformidade. Devido à proveniência biotecnológica do anticorpo monoclonal, o risco de contaminação por agentes patogénicos infecciosos está praticamente excluído. Devido ao conteúdo do material de origem animal (soro de vitelo fetal, agente estabilizante), o mesmo deve ser manuseado como sendo potencialmente infeccioso.
Devido ao teor de azida sódica, o contacto com a pele e as mucosas deve ser evitado e, caso necessário, os mesmos devem ser limpos com bastante água. Uma vez que a aplicação da aglutinação em lâmina de microscópio é trabalhada com agentes patogénicos originais, devem ser respeitadas as medidas de proteção no trabalho (perigo de infecção).

Materiais de trabalho e equipamentos não fornecidos
Água destilada, soro fisiológico (NaCl), lâminas de vidro, agitador, contentor para eliminar materiais infecciosos, tubos de ensaio de teste ou microplacas de titulação (formato em U), pipetas, pontas de pipeta, banho-maria, incubador.

Material de teste e condições de cultura
O material de teste é vertido sobre a seletividade diferente do meio de cultura e incubado durante 16-20 horas a uma temperatura entre 35...37 °C.

1. Aglutinação em lâmina de microscópio
1.1. Produtos poli-específicos
Preferencialmente, de 5 a 10 colónias de *E. coli* suspeitas é esfregado algum volume de bactérias numa lâmina de microscópio e uma gota de reagente de teste (cerca de 25 µl) para uma suspensão homogénea e ligeiramente leitosa. A lâmina de microscópio deverá estar pousada numa base escura. A lâmina de microscópio é levantada contra uma fonte de luz com fundo preto, rodada e o resultado é lido a olho nu. Os meios de cultura seletivos podem prejudicar a capacidade de aglutinação das bactérias. Este problema é evitável através da remoção do material de cultura de agar nutritivo ou agar sangue ou meio de cultura Kligler. Para excluir as aglutinações espontâneas, deverá utilizar-se um controlo negativo com NaCl em vez do reagente de teste.

Avaliação dos resultados
Só é possível uma avaliação se o controlo negativo (CN) permanecer turvo com aspeto leitoso. **Positivo:** Aglutinação visível após 1 a 20 oscilações. Se existir uma reação positiva acentuada (RP), ocorre imediatamente uma aglutinação (flocos grossos ou finos) ao friccionar o volume de bactérias, com resultado positivo fraco apenas após 10 a 20 oscilações.



Negativo: Uma suspensão que permaneça turva e leitosa ou uma reação que ocorra após mais de 20 oscilações é um resultado negativo (RN).

1.2. Produtos monoespecíficos
Da colónia que no teste descrito em 1.1. teve reação positiva, é definida uma subcultura num meio de cultura não seletivo (agar nutritivo ou agar sangue). Este material de cultura é analisado, conforme descrito em 1.1., com os anticorpos monoespecíficos, que são componentes do reagente de teste poli-específico correspondente. Um resultado positivo necessita, para exclusão de aglutinações não específicas, da análise na reação de Widal (Teste de confirmação) a seguir descrita).

2. Reação de Widal (Teste de confirmação)
As bactérias da subcultura são retiradas com NaCl e cozidas durante 1 h para destruir o antigene K termolábil. De seguida, a suspensão de bactérias com NaCl é ajustada para uma concentração de cerca de 10^9 bactérias/ml (padrão 3 de McFarland) e utilizada como suspensão de antigene.

2.1. Teste em tubo de ensaio de Widal
É produzida uma sequência de diluição geométrica com fator 2 a partir do reagente de teste monoespecífico homólogo com NaCl nos tubos de ensaio corretamente rotulados, com base na diluição de 1:25 (por exemplo, 50 µl de reagente de teste + 1,2 ml NaCl).
São submetidos 0,5 ml de NaCl a cada tubo de ensaio. No primeiro tubo da sequência de diluição descendente, são pipetados 0,5 ml do reagente de teste previamente diluído de 1:25 (1:50). Após misturar bem, são pipetados desta mistura 0,5 ml no segundo tubo de ensaio. Proceder de forma análoga até ao último tubo de ensaio da sequência de diluição, do qual, após misturar, retirar 0,5 ml e rejeitar esta quantidade. Em cada tubo de ensaio são introduzidos 0,5 ml da suspensão de antigene determinada, obtendo-se uma diluição inicial do reagente de teste de 1:100. Os tubos são cobertos e incubados durante 16-20 h em banho-maria ou num incubador a uma temperatura de 50 °C.

2.2. Teste em microplacas de titulação de Widal
A partir do reagente de teste monoespecífico, é produzida uma sequência de diluição com NaCl numa microplaca de titulação rotulada corretamente (placa U), com um fator 2, começando com a diluição de 1:25. Para isso, são adicionados 50 µl de NaCl a cada poço de uma sequência (poços A–H), do primeiro ao último. No primeiro poço são colocados 50 µl do reagente de teste com uma diluição prévia de 1:25. Após misturar bem, são pipetados 50 µl dessa mistura no segundo poço e após uniformização, são colocados 50 µl no terceiro poço, e assim sucessivamente. Do último poço são rejeitados 50 µl da mistura.
De seguida, são acrescentados a cada diluição do reagente de teste 50 µl da suspensão de antigene, obtendo-se uma diluição inicial de 1:100. A microplaca de titulação é agitada, coberta e incubada durante 16-20 h a 50 °C numa câmara húmida.

2.3. Controlos de qualidade
2.3.1. Controlo positivo
A comprovação dos procedimentos de teste exatos deve ser executada na especificidade conhecida das estirpes de qualidade. Para isso, é importante que as estirpes utilizadas para esse fim consigam exprimir bem os seus antigenes na superfície da célula. Recomenda-se, assim, que sejam usadas estirpes de proveniência interlaboratorial ou de proveniência definida de estirpes de campo caracterizadas como externas. para aplicação do controlo de qualidade.

2.3.2. Controlos negativos
Reagente de teste Ao invés de antigene de teste é misturado NaCl com uma diluição de 1:25 do anticorpo monoespecífico.
Controlo de antigene Ao invés de reagente de teste é misturado NaCl com a suspensão de antigene de teste.
Controlo de soro 1 ml ou 100 µl de solução de NaCl são pipetados no tubo de ensaio ou num poço.

Avaliação do teste em tubo de ensaio
A aglutinação é avaliada preferencialmente com um aglutinoscópio após se ter agitado ligeiramente o tubo de ensaio. No caso de uma reação positiva, são claramente visíveis os aglutinados; no caso de uma reação negativa, o fluido no tubo de ensaio permanece turvo e com aspeto leitoso.

Avaliação das microplacas de titulação
As placas são levantadas para avaliação da reação e avaliadas visualmente à contraluz. No caso de um resultado positivo, os aglutinados formam como que uma fina película. É também considerado positivo quando se formam imediatamente pequenos botões, mas no entanto é bastante mais pequeno em comparação com o controlo por antigene e não escorre quando é levantado. No caso de uma reação negativa, o antigene adquire a forma de um botão no fundo do poço e escorre pela placa, formando uma língua, quando a mesma é levantada.

Avaliação dos resultados
Apenas quando a estirpe em estudo conseguir aglutinar o anticorpo monoespecífico utilizado até à titulação O indicada no frasco (é permitido um desvio de cerca de ± 1 de nível de titulação), ficará comprovado que pertence ao serotipo em questão. Os controlos negativos não deverão apresentar quaisquer aglutinações.

Limitações do método
Les Os reagentes de teste reagem com as estirpes de *E. coli* que contêm antigenes das especificidades declaradas.
Em virtude das inúmeras estirpes de *E. coli* com diferentes antigenes de superfície, não estão excluídas possíveis reações cruzadas.
Devido à relação entre antigenes, poderão ocorrer reações cruzadas com outras enterobactérias.
Os procedimentos de aglutinação são meramente indicativos e não comprovativos de patogenicidade. Para a atribuição clara de isolados de *E. coli* a grupos de patógenos, é necessária a determinação dos fatores de virulência (R. Prager, H. Tschäpe, Mikrobiologie 17 (2007), 213-219).

Explicação dos símbolos utilizados

LOT	Número do lote (Denominação do lote)		Utilizável até AAAA-MM (MM = Fim do mês)
REF	Número do pedido		Limitação de temperatura
IVD	Diagnóstico in vitro		Esteja atento às instruções de utilização
TR	Reagente de teste		Aglutinação em lâmina de microscópio
mTR	Reagente de teste monoclonal	LYO	liofilizado
MTP	Teste em microplacas de titulação	TUBE	Teste em tubo de ensaio
O-TIT	Titulação O		

Data da edição: 10/09/2019