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

Reactivo de ensayo para la prueba de aglutinación en portaobjetos

INFORMACIÓN DE USO PARA PERSONAL ESPECIALIZADO

CE IVD

es

Uso previsto
Los reactivos de ensayo se utilizan para la detección serológica y para la identificación del serovar de cepas de *E. coli* aisladas a partir de material de ensayo de origen humano y de otros orígenes mediante la prueba de aglutinación en portaobjetos y la reacción de Widal (test de confirmación).

Principio del ensayo
Si la cepa de *E. coli* posee un antígeno correspondiente al rango de detección del reactivo de ensayo, este se ligará al anticuerpo específico al realizar la mezcla. Como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo la cepa se ve claramente aglutinada.

Composición
Los **reactivos de ensayo** son sueros inmunes absorbidos de conejos, una mezcla de sueros inmunes absorbidos de conejos y de anticuerpos monoclonales o contienen solo anticuerpos monoclonales.
Conservante: azida sódica (NaN_3) 0,9 mg/ml

Especificidades poliespecíficas disponibles

Denominación	contiene anticuerpos 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 -

Available monospecific specificities

Denominación	Denominación	Denominación	Denominación
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	

Los reactivos de **ensayo poliespecíficos** son liofilizados y antes de su uso deben diluirse en 1 ml o 5 ml de agua destilada en función de la cantidad declarada y cerrarse bien con la pipeta cuentagotas adjunta. Tras la rehidratación, están listos **para su uso**.
Los reactivos de **ensayo monoespecíficos** son liofilizados y deben rehidratarse en un 1 ml de agua destilada. Estos reactivos de ensayo monoespecíficos rehidratados están listos **para su uso** en la prueba de aglutinación en portaobjetos. Para el test de Widal en tubo de ensayo o el test de Widal sobre placas de microtitulación se utiliza el reactivo de ensayo rehidratado para preparar la serie de disolución (véase 2.1. o 2.2.).

Vida útil y condiciones de almacenamiento
Si los reactivos de ensayo se almacenan sin abrir su embalaje original a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, se podrán utilizar hasta la fecha indicada en la etiqueta. Una vez abiertos y disueltos, deberán cerrarse bien con la pipeta suministrada. A entre 2 °C y 8 °C los productos poliespecíficos podrán utilizarse, como mínimo, durante 18 meses; y los monoespecíficos, como mínimo, durante 24 meses. Sin embargo, no deberán utilizarse nunca una vez transcurrida la fecha que aparece en la etiqueta. En ocasiones puede que los reactivos de ensayo presenten turbidez de origen no microbiano. Sin embargo, la turbidez no disminuye el efecto de los reactivos de ensayo y puede eliminarse mediante centrifugación o filtración.
Antes de utilizar los reactivos de ensayo, los mismos deben aclimatarse a temperatura ambiente (entre 18 °C y 26 °C).

Advertencias y precauciones de uso
Los reactivos de ensayo, que contienen material biológico en forma de suero de conejo, deberían considerarse como potencialmente infecciosos y manipularse como tales. Debido a la preparación biotecnológica de los anticuerpos monoclonales, el riesgo de contaminación por agentes patógenos infecciosos es prácticamente nulo. Puesto que contienen material animal (suero fetal de ternera, estabilizadores), deberían manipularse como productos potencialmente infecciosos. Además, debido a que contienen azida sódica, debe evitarse que entren en contacto con la piel y las mucosas. Si lo hicieran, enjuagar con agua abundante. Para realizar la prueba de aglutinación en portaobjetos se trabaja con materiales patógenos nativos, por lo que deberán respetarse las medidas de seguridad laboral (riesgo de infección).

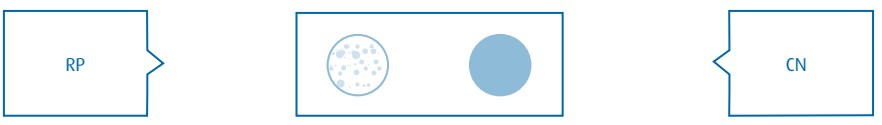
Materiales de trabajo y equipos no suministrados
Agua destilada, suero fisiológico (NaCl), portaobjetos de vidrio, varillas de agitación, contenedores para desechar materiales infecciosos, tubos de ensayo o placas de microtitulación (en forma de U), pipetas, puntas de pipeta, baño maría, incubadora.

Material de ensayo y condiciones para el cultivo
El material de ensayo se vierte en medios de cultivo de diferente selectividad y se incuba entre 16 y 20 horas a 35...37 °C.

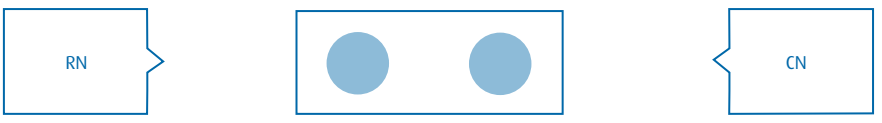
1. Prueba de aglutinación en portaobjetos

1.1. Productos poliespecíficos
Transferir pequeñas cantidades de masa bacteriana de, preferiblemente, entre 5 y 10 colonias sospechosas de contener *E. coli* a un portaobjetos y mezclarlas cada vez con una gota de reactivo de ensayo (25 µl aprox.) para obtener una suspensión homogénea, ligeramente lechosa. El portaobjetos debería colocarse sobre una base oscura. Para leer el resultado a simple vista, deberá colocarse el portaobjetos delante de una fuente de luz, contra un fondo negro, y girarse. Los medios de cultivo selectivos pueden reducir la capacidad de aglutinación de las bacterias. Para evitarlo, debe extraerse el medio de cultivo de agar nutritivo o agar sangre o el medio de cultivo de Kliger. Para evitar las aglutinaciones espontáneas deberá realizarse un control negativo con NaCl en lugar de con reactivo de ensayo.

Evaluación de los resultados
Solo podrá realizarse una evaluación si el control negativo (CN) permanece turbio y lechoso.
Positivo: Aglutinación visible tras girar la muestra entre 1 y 20 veces. En reacciones positivas (RP) fuertes, la aglutinación (copos gruesos o finos) se detecta directamente en el momento en el que se mezcla la masa bacteriana; mientras que en resultados positivos más débiles se detecta tras girar la muestra entre 10 y 20 veces.



Negativo: Si la suspensión permanece turbia y lechosa o se produce una reacción tras haber girado la muestra más de 20 veces, la reacción es negativa (RN).



1.2. Productos monoespecíficos
Preparar un subcultivo en un medio de cultivo no selectivo (agar nutritivo o agar sangre) a partir de la colonia que en la prueba 1.1. ha mostrado una reacción positiva. Este material de cultivo se examinará con los anticuerpos monoespecíficos que forman parte del reactivo de ensayo poliespecífico correspondiente, tal como se describe en el apartado 1.1. Para descartar aglutinaciones no específicas, los resultados positivos deben someterse a la reacción de Widal (test de confirmación) descrita a continuación.

2. Reacción de Widal (test de confirmación)
Las bacterias del subcultivo deben enjuagarse con NaCl y bullir durante 1 h para destruir los antígenos K termolábiles. A continuación debe ajustarse la suspensión bacteriana con NaCl a una densidad de gérmenes de unas 10^9 bacterias/ml (estándar 3 de turbidez de McFarland) y utilizarse como una suspensión de antígeno.

2.1. Test de Widal en tubo de ensayo
A partir de un reactivo de ensayo monoespecífico homólogo debe prepararse, con NaCl, una serie geométrica de diluciones con el factor 2 en tubos en ensayo correctamente rotulados, empezando por una dilución de 1:25 (por ejemplo, 50 µl reactivo de ensayo + 1,2 ml NaCl). Para ello se preparan los tubos de ensayo con 0,5 ml de NaCl en cada uno de ellos. A continuación, con una pipeta, se añaden 0,5 ml del reactivo de ensayo prediluido (1:25) al primer tubo de ensayo de la serie de diluciones decreciente (1:50). Tras mezclar exhaustivamente se añaden con la pipeta 0,5 ml de esta mezcla en el segundo tubo de ensayo. Se procederá del mismo modo hasta llegar al último tubo de ensayo de la serie de disoluciones, del cual, una vez realizada la mezcla, se extraerán también los correspondientes 0,5 ml y se desecharán. A continuación se añaden 0,5 ml de la suspensión de antígeno ajustada, con lo cual se obtendrá una dilución inicial del reactivo de ensayo de 1:100. Por último se tapan los tubos de ensayo y se incuban al baño maría entre 16 y 20 horas o en la incubadora a 50 °C.

2.2. Test de Widal sobre placas de microtitulación
A partir de un reactivo de ensayo monoespecífico homólogo debe prepararse, con NaCl, una serie de diluciones con el factor 2 sobre una placa de microtitulación correctamente rotulada (placa U), empezando por una dilución de 1:25. Para ello se añaden 50 µl de NaCl en cada pocillo de una fila (pocillos A-H). En el primer pocillo se añaden 50 µl del reactivo de ensayo prediluido a 1:25. Tras mezclar exhaustivamente se añaden con la pipeta 50 µl de dicha mezcla al segundo pocillo. Se vuelve a mezclar y se añaden 50 µl de dicha mezcla al tercer pocillo y así sucesivamente. Al llegar al último pocillo se extraen los correspondientes 50 µl de mezcla y se desechan. A continuación se añaden 50 µl de la suspensión de antígeno a cada disolución del reactivo de ensayo, con lo cual se obtendrá una dilución inicial de 1:100. Por último, se agita la placa de microtitulación, se tapa y se incuba en una cámara húmeda entre 16 y 20 horas a 50 °C.

2.3. Controles de calidad

2.3.1. Control positivo
Para comprobar que el ensayo se ha realizado de forma exacta debería utilizarse una cepa de calidad de una especificidad conocida. Para ello, es importante que las cepas utilizadas expresen bien sus antígenos en la superficie de la célula. Por eso, para realizar los controles de calidad se recomienda utilizar cepas procedentes de ensayos interlaboratorio o cepas silvestres de origen definido debidamente caracterizadas en laboratorios externos.

2.3.2. Controles negativos
Reactivo de ensayo En lugar del antígeno de ensayo, se mezcla NaCl con la disolución 1:25 del anticuerpo monoespecífico.
Control del antígeno En lugar del reactivo de ensayo, se mezcla NaCl con la suspensión del antígeno de ensayo.
Control del cloruro de sodio Se añade 1 ml o 100 µl solución de NaCl en un tubo de ensayo o en un pocillo.

Evaluación del test en tubo de ensayo
La aglutinación debe evaluarse preferiblemente con un aglutinoscopio después de agitar ligeramente los tubos de ensayo. Si la reacción es positiva, los aglutinatos se verán claramente. Si la reacción es negativa, el líquido del tubo de ensayo seguirá siendo turbio y lechoso.

Evaluación de la placa de microtitulación
Para evaluar la reacción deben sostenerse las placas a contraluz y evaluarse visualmente. En caso de reacción positiva, los aglutinatos formarán una película. También se considerará una reacción positiva la formación de un pequeño botón que, en comparación con el control de antígenos, es mucho más pequeño y no se derrama al levantar la placa. En caso de reacción negativa, el antígeno se deposita en forma de botón en el fondo del pocillo y se derrama en forma de lengua al levantar la probeta.

Evaluación de los resultados
Solo se confirmará la pertenencia de la cepa examinada al estereotipo relevante si esta aglutina los anticuerpos monoespecíficos utilizados hasta el título O mencionados en la etiqueta de la ampolla (se admiten desviaciones de ± 1 nivel del título). Los controles negativos no pueden presentar aglutinación.

Limitaciones del método
Los reactivos de ensayo reaccionan con cepas de *E. coli* que contienen antígenos de las especificidades declaradas. Debido a la multitud de cepas de *E. coli* con diferentes antígenos de superficie, no se descarta que se produzcan reacciones cruzadas. Por razones de parentesco de los antígenos, pueden producirse reacciones cruzadas con otras enterobacteriáceas. Los procedimientos de aglutinación son solo una indicación de patogenidad y no pueden considerarse una prueba de ello. Para poder clasificar los aislamientos de *E. coli* de manera unívoca en grupos de agentes patógenos, es necesario determinar los factores de virulencia (R. Prager, H. Tschäpe, Mikrobiologie 17 (2007), 213-219).

Explicación de los símbolos utilizados

LOT	Código de lote		Utilizar antes de AAAA-MM (MM = final del mes)
REF	Número de referencia del catálogo		Límite de temperatura
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Consultar las instrucciones de uso
TR	Reactivo de ensayo		Prueba de aglutinación en portaobjetos
mTR	Reactivo de ensayo monoclonal	LYO	Liofilizado
MTP	Test sobre placas de microtitulación	TUBE	Test en tubo de ensayo
O-TIT	Título O		

Fecha de esta versión: 10/09/2019