

Testovací séra, testovací reagentie, Enteroclony Anti-Coli



Informace pro kvalifikované pracovníky

Obvyklé použití

Testovací séra/testovací reagentie/Enteroclony jsou určeny pro použití při sérologické identifikaci a určení sérovaru kmenů *E. coli* izolovaných z testovaného materiálu humánního nebo jiného původu s použitím skličkové aglutinace a Widalovy reakce (konfirmační test).

Princip testu

Pokud kmen *E. coli* obsahuje antigen, který je zahrnut v testovacím séru/testovací reagentii/Enteroclonu, je tento antigen navázán při smíchání se specifickou protilátkou. Výsledkem reakce antigen-protilátka je jasně viditelná aglutinace tohoto kmene.

Složení

Testovací séra jsou absorbovaná séra z imunizovaných králíků. Testovací reagentie jsou sestaveny ze směsi absorbovaných sér z imunizovaných králíků a monoklonálních protilátek. Enteroclony obsahují pouze monoklonální protilátky. Termín Enteroclon je užívaný společností pro produkty, které jsou připravovány výhradně z monoklonálních protilátek.

Konzervans: azid sodný (NaN₃) 0.9 mg/ml

Dostupné poly-specifické produkty

Název	obsahuje protilátky proti
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 -)

Dostupné monospecifické produkty

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

Polyspecifická testovací séra/testovací reagenty jsou lyofylozovány a musí se před použitím rozpustit v 1 nebo 5 ml destilované vody (množství je napsáno na štítku) a dobře uzavřít přiloženou pipetou. Po rehydrataci jsou připraveny k použití.

Monospecifické produkty jsou rovněž lyofilizovány a musí se rehydratovat v 1 ml destilované vody.

U sklíčkové aglutinace se rehydratovaná monospecifická séra/reagenty/Enteroclony musí ředit ve fyziologickém roztoku na stupeň ředění daný PA. U aglutinace ve zkumavce nebo mikrometodou se rehydratované produkty používají pro přípravu sériových ředění.

Exspirace a podmínky skladování

Pokud skladujeme neotevřená balení testovacích sér/testovacích reagentů/Enteroclonů při teplotě 2-8 °C, mohou být používány až do data uvedeného na obalu. Jednou otevřená a rehydratovaná balení se musí dobře uzavřít přiloženou pipetou.

Pokud jsou polyspecifická séra skladována při 2-8 °C, zůstávají použitelné nejméně 18 měsíců a monospecifické produkty nejméně 24 měsíců.

Nicméně není možné je používat po datu uvedeném na obalu.

Testovací séra někdy mohou vykazovat zákal, který není způsoben mikrobiální kontaminací. Tento zákal nezhoršuje účinnost a séra lze vyčistit centrifugací nebo filtrací.

Upozornění a varování

Biotechnologická výroba Enteroclonů znamená, že riziko kontaminace infekčním agens lze virtuálně vyloučit. Protože obsahují živočišné materiály (fetální telecí sérum, stabilizátor), je třeba je považovat za potenciálně infekční a náležitě s nimi manipulovat.

Testovací séra jsou biologický materiál, který je třeba považovat za potenciálně infekční a musí se s nimi proto náležitě manipulovat.

Protože tento materiál obsahuje azid sodný, vyvarujte se styku s kůží a sliznicemi. V případě zasažení prosím opláchněte místo velkým množstvím vody.

Vzhledem k tomu, že provedení sklíčkové aglutinace vyžaduje práci s živým patogenním materiálem, musí se dodržovat všechny nezbytné ochranné pracovní postupy (nebezpečí infekce)!

Materiál a zařízení, které není součástí tohoto balení

Destilovaná voda, fyziologický roztok (NaCl), sklíčka, míchací tyčinky, nádoba pro likvidaci infekčního materiálu, zkumavky nebo mikrotitrační destičky (U dno), pipety, pipetovací špičky, vodní lázeň a inkubátor.

Testovaný materiál a metodika

1. Sklíčková aglutinace

1.1. Příprava polyspecifických sér

Přemístěte malé množství bakteriální hmoty z 5-10 podezřelých kolonií na sklíčko a dobře promíchejte s kapkou testovacího séra/reagenty (asi 25 µl), až do vytvoření homogenní, lehce mléčné suspenze. Sklíčko je třeba umístit na tmavé pozadí.

Reakce se odečítá pouhým okem držím sklíčko před světelným zdrojem proti černému pozadí a jeho naklápěním tam a zpět.

Ve výjimečných případech mohou selektivní média nepříznivě ovlivnit schopnost aglutinace bakterií. Tento problém lze obejít tím, že vyjmeme bakterie z živného nebo krevního agarů nebo z Kliglerova kultivačního média. Je třeba zároveň udělat i kontrolu

spontánní aglutinace, negativní kontrolu, a to s použitím fyziologického roztoku místo testovacího séra/reagencie.

Interpretace výsledků analýzy

Test je možné hodnotit pouze pokud negativní kontrola zůstane mléčně zakalená.

Pozitivní: Viditelná aglutinace poté, co je vzorek naklopen méně než 20x tam a zpět. U silně pozitivní reakce (PR), aglutinace (hrubě nebo jemně vločkovitá) se objeví okamžitě po smíchání s bakteriální masou. U slabě pozitivní reakce se aglutinace objeví pouze po naklopení 10-20x tam a zpět.

1.2. Příprava monospecifických sér

Nejprve připravte subkulturu z kolonie, která má pozitivní reakci v testu popsáném v bodě 1.1. Potom vyšetřete materiál z této kultury tak, jak je popsáno v bodě 1.1. s použitím monospecifických protilátek obsažených v příslušném polyspecifickém testovacím séru/testovací reagencii.

Pozitivní výsledek se musí ověřit konfirmačním testem popsáným níže, aby se vyloučily vlivy jakékoliv souběžné nespecifické aglutinace.

2. Konfirmační test

Spláchněte bakterie ze subkultury fyziologickým roztokem a vařte je po dobu 1 hodiny, čímž dojde k likvidaci termolabilních K-antigenů. Poté adjustujte bakteriální suspenzi pomocí NaCl až na hustotu 10^9 bakterií/ml (McFarlandův Standard č.3) a použijte ji jako antigenní suspenzi.

2.1. Zkumavkový test

Připravte si sérii ředění homogenního monospecifického produktu ve fyziologickém roztoku v postupné geometrické řadě s faktorem ředění 2 a začněte ředěním 1:25 (např. 50 μ l reagencie + 1,2 ml NaCl). Nejprve přidejte 0,5 ml NaCl do každé zkumavky. Potom s použitím pipety přidejte 0,5 ml předředěné (1:25) reagencie do první zkumavky sériového ředění (1:50). Promíchejte a s použitím pipety odpipetujte 0,5 ml z této zkumavky do další zkumavky v řadě. Analogicky postupujte až k poslední zkumavce sériového ředění. Z poslední zkumavky odstraňte po promíchání 0,5 ml roztoku a zlikvidujte.

Do každé zkumavky přidejte 0,5 ml adjustované antigenní suspenze, což dává počáteční ředění testovacího séra/reagencie/Enteroclonu 1:100. Uzavřete zkumavky a inkubujte ve vodní lázni nebo inkubátoru po dobu 16-20 hodin při 50 °C.

2.2. Mikrometoda

Připravte si sérii ředění homogenního monospecifického testovacího séra/reagencie/Enteroclonu ve fyziologickém roztoku do vhodně označené mikrotitrační destičky (U-dno). Sériové ředění by mělo být v postupné geometrické řadě s faktorem ředění 2, začněte ředěním 1:25 (např. 50 μ l reagencie + 1,2 ml NaCl). Nejprve přidejte 50 μ l NaCl do každé do každé jamky jednoho ředění (jamky A-H). Potom s použitím pipety přidejte 50 μ l předředěné (1:25) protilátky do první jamky. Dobře promíchejte a přepipetujte 50 μ l z první jamky do druhé. Dobře promíchejte a analogicky pokračujte až k poslední jamce. Z poslední jamky po promíchání odpipetujte 50 μ l a zlikvidujte. Potom

přidejte 50 µl antigenní suspenze ke každému protilátkovému ředění, což dává počáteční ředění 1:100.

Protřepejte mikrotitrační destičku, přikryjte a umístěte do vlhké komůrky, kde je třeba ji inkubovat po dobu 16-20 hodin při 50 °C.

2.3. Kontrola kvality

Kvůli validitě testů je třeba testovat pozitivní a negativní kontroly paralelně.

2.3.1. Pozitivní kontrola

Testování příslušného sérotypu kontrolního kmene musí být analogické k izolovanému kmeni.

2.3.2. Negativní kontrola

Kontroly testovací séra/reagencie/Enteroclonu

Místo testovaného antigenu použijte pro smíchání s předředěnou (1:25) monospecifickou protilátkou jen NaCl.

Kontrola antigenu

Místo reagencie smíchané s testovanou antigenní suspenzí použijte pouze NaCl.

Kontrola fyziologického roztoku

Přidejte s použitím pipety 1 ml (nebo 100 µl) NaCl roztoku do testovací zkumavky (nebo jamky).

Vyhodnocení zkumavkového testu

Lehce protřepejte každou zkumavku a vyhodnoťte reakce nejlépe pomocí aglutinoskopu proti tmavému pozadí.

Reakce je pozitivní při formování jasně viditelné aglutinace. Při negativní reakci zůstává tekutina ve zkumavce mléčně zakalená.

Vyhodnocení mikrotitrační destičky

Držte si destičku nad světleným zdrojem a pouhým okem vyhodnoťte reakci.

Reakce je pozitivní při precipitaci aglutinace ve formě blanek nebo tenké kůže. Pozitivní výsledek je také v případě vzniku knoflíku pokud je signifikantně menší než kontrolní antigen a neteče nebo nepohybuje se ve chvíli, kdy držíte destičku.

Při negativní reakci antigen precipituje na dně jamky ve formě knoflíku, který teče nebo se pohybuje do tvaru jazyka ve chvíli, kdy držíte destičku.

Titř, který se počítá, je hladina ředění séra při které byla jasně viditelná pozitivní reakce.

Interpretace výsledků analýzy

Hodnocení izolovaného kmene vzhledem k příslušnému sérotypu je platné pouze pokud izolovaný kmen a kontrolní kmen aglutinují monospecifickou protilátkou použitou v testu až k O-titru deklarovanému na lahvičce (odchytky do jedné titrační jednotky jsou povoleny).

Zbývající kontroly musejí být zcela bez aglutinace.

Vysvětlení použitých symbolů



in vitro diagnostikum



číslo šarže (LOT)



katalogové číslo



skladovací podmínky



datum expirace RRRR-MM (MM = konec měsíce)

Datum revize: květen 2005

Datum překladu: leden 2011

Výrobce:

SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin

Berliner Allee 317/321

13088 Berlin

Germany

www.sifin.de

Zplnomocněný zástupce výrobce v České republice:

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Tůmová 2265/60, 616 00 Brno

IČ: 634 71 507, DIČ: CZ63471507