

Instrukcja użycia

ANTYSUROWICE *E. COLI*



ANTYSUROWICE *E. COLI*

Do użytku w diagnostyce *in vitro*

Zamierzone użycie

Antysurowice *Escherichia coli* (*E. coli*) są używane w pomocy diagnostycznej *in vitro* do jakościowego i ręcznego, pełnego lub częściowego, serotypowania bakterii metodą aglutynacji szkiełkowej, do aglutynacji przez noc w płytkach do mikromiareczkowania o okrągłym dnie i/lub aglutynacji w probówkach Widala. Ważne jest, aby do oznaczania antygenów bakteryjnych używać izolatów czystych hodowli.

Opis

Antysurowice *E. coli* O, H, K9 i F służą do pełnego serotypowania, natomiast antysurowice OK O służą do badań przesiewowych.

Surowice O są przeznaczone do określania serotypu przy użyciu gotowanej hodowli. Antysurowice H są przeznaczone do serotypowania z hodowli zabitych formaliną, a K9, F i OK O do przesuwania żywych hodowli z nieselektywnej płytki agarowej.

Typy antysurowic	Objętość fiolki	Liczba testów
pula OK O i pojedyncze OK O	3 ml	150
pula O i pojedyncze O	3 ml	35
pojedyncze O	1 ml	12
pojedyncze O, wysokie miano	1 ml	48
pula H	3 ml	30
pojedyncze H	5 ml	50
K9	1 ml	50
Surowice wyrostkowe	5 ml	250

Tabela 1. Produkty załączone w tej instrukcji użycia.

Wszystkie antysurowice *E. coli* są absorbowane bez reakcji krzyżowych. Dla antysurowic z puli OK O, pule są absorbowane tylko dla serotypów zawartych w innych pulach OK O.

Antysurowice są poliklonalne, przygotowane w królikach z użyciem szczepów referencyjnych zgodnie z metodami zalecanymi przez Światową Organizację Zdrowia i absorbowane w celu wyeliminowania przeciwciał reagujących krzyżowo. Antysurowice *E. coli* są przeznaczone wyłącznie do użytku przez pracowników laboratoriów i/lub pracownika służby zdrowia.

Antysurowice E. coli OK O OK O są przeznaczone do badań przesiewowych żywych hodowli z nieselektywnej płytki agarowej. Pule zostały zaabsorbowane bez reakcji krzyżowych względem siebie (pula 1 nie będzie reagować krzyżowo z serotypami z puli 2 i 3 itd.), natomiast pojedyncze antysurowice zostały zaabsorbowane bez reakcji krzyżowych względem serotypów zawartych w odpowiadającej im puli. Wynik OK O jest wynikiem badania przesiewowego. Ważne jest, aby grupa O została potwierdzona przez aglutynację antysurowicą O przy użyciu gotowanej kultury. Dostępne antysurowice OK O służą do wykrywania najczęściej występujących i patogennych dla człowieka *E. coli*.

Surowice E. coli O O są przeznaczone do określania serotypu gotowanych hodowli. Gotowanie hodowli *E. coli* usuwa stabilne termiczne antygeny na powierzchni komórki. Antygeny te mogą pokrywać antygeny O i możliwe są reakcje krzyżowe przeciwko innym antygenom niż antygeny O. Wszystkie antysurowice pojedyncze i zbiorcze O są absorbowane bez reakcji krzyżowych przeciwko innym antygenom O. Niektóre szczepy (np. O8, O9, O20 i O101) mają termostabilne kwaśne kapsułki (antygeny K) przypominające antygeny O lipopolisacharydu i mogą one czasami pokrywać antygen O. Takie szczepy można określić serotyp tylko po autoklawowaniu hodowli bulionowej w temperaturze 121°C przez 2 godziny. Gotowej do użycia antysurowicy O nie należy rozcieńczać, natomiast antysurowicę O o wysokim mianie należy rozcieńczyć w soli fizjologicznej, pH 7,4, zgodnie z opisem na etykiecie¹

Surowice E. coli H H są przeznaczone do określania serotypu H w hodowli zabitej formaliną. Formalina utrzuca antygen H, dzięki czemu aglutynacja jest łatwiejsza do zauważenia. Podczas pracy z formaliną należy używać dygestorium¹.

Surowica E. coli K9 K9 jest przeznaczona do badania przesiewowego żywej hodowli.

Antysurowice E. coli fimbrial F są przeznaczone do badań przesiewowych żywych hodowli z nieselektywnej płytki agarowej (do wykrywania antygenu F4) lub z płytki agarowej Minca IS (do wykrywania antygenu F5). Wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne mogą wystąpić w przypadku użycia bakterii z innego podłoża selektywnego. Antysurowice F4 i F5 to najczęściej występujące adhezyny wyrostkowe, które pomagają ETEC w wiązaniu się z błoną śluzową jelita.

Zasada

Kompleksy antygen-przeciwciało powstają (aglutynacja) po zmieszaniu hodowli bakteryjnej ze specyficzną surowicą skierowaną przeciwko składnikom powierzchniowym bakterii. Kompleksy są zwykle widoczne gołym okiem, co pozwala na łatwe oznaczenie antygenów O, H i F metodą aglutynacji¹.

Środki ostrożności

- Przed użyciem antysurowicy *E. coli* firmy SSI Diagnostica, należy potwierdzić, że szczep jest *E. coli*, np. poprzez użycie metody biochemicznej.
- Szorstkie hodowle/szczepy będą się samoaglutynować i powodować fałszywie pozytywne reakcje.
- Nadmierna ilość hodowli w stosunku do antysurowicy może powodować reakcje fałszywie pozytywne.
- W przypadku antysurowicy do aglutynacji szkiełkowej należy upewnić się, że wynik zostanie odczytany w ciągu 10 sekund.
- Zmętnienie spowodowane wytrącaniem się lipoprotein może wystąpić po dłuższym przechowywaniu. W przypadku wystąpienia wytrącenia i/lub zanieczyszczenia można je usunąć przez wirowanie (10 000 g), a następnie sterylną filtrację (0,22 µM).
- Antysurowice zostały zatwierdzone do serotypowania wyłącznie za pomocą opisanych poniżej metod.
- Nie należy stosować antysurowic, które przypadkowo zostały zamrożone.
- Badany szczep musi być hodowany na nieselektywnej płytce agarowej. Należy upewnić się, że szczep jest czystą hodowlą.
- Nie należy stosować antysurowic po upływie ich terminu ważności.
- Sprawdzić fiolkę przed użyciem, aby upewnić się, że jest nienaruszona. Wszelkie uszkodzone fiolki należy wyrzucić.

Materiały dostarczone

Antysurowice *E. coli* firmy SSI Diagnostica są dostarczane w butelkach z kroplomierzem zawierających 1, 3 lub 5 ml gotowych do użycia antysurowic. Antysurowice *E. coli* o wysokim mianie są dostarczane w butelkach z kroplomierzem zawierających 1 ml, który należy rozcieńczyć w stosunku 1:4. (patrz tabela 1).

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Nieselektywne podłoże agarowe (np. agar z ekstraktem wołowym)
- Sól fizjologiczna pH 7,4
- Eza do zaszczepiana lub wykałaczką
- Pipety
- Inkubator (35–37°C)

Dodatkowe antysurowice OKO O i K9

- Szkiełko szklane

Dodatkowa antysurowica O

- Bulion infuzyjny
- Płytką do mikromiarczkowania o okrągłym dnie
- Torebka foliowa
- Inkubator (50–52°C)
- Łaźnia wodna (100°C)

Dodatkowa antysurowica H

- Bulion infuzyjny (np. bulion *E. coli*)
- Półstały agar
- Pipety do przenoszenia
- Szklane probówki (probówki Widala)
- Łaźnia wodna lub inkubator (50–52°C)

Dodatkowa antysurowica F

- Płytki agarowe Minca IS (IS = Iso Vitalex)
- Szkiełka szklane

Przechowywanie i stabilność

Data ważności jest wydrukowana na etykiecie.

Antysurowice *E. coli* powinny być przechowywane w temperaturze 2–8°C i w ciemnym miejscu. Nie zamrażać. Przechowywane w tych warunkach antysurowice mogą być używane do daty ważności podanej na etykiecie produktu.

Na stabilność podczas stosowania nie ma wpływu praca z surowicą na stole przez cały dzień, jeżeli jest ona przechowywana w temperaturze 2–8°C, gdy nie jest stosowana, przez okres nie dłuższy niż 4 lata od daty produkcji, z wyjątkiem antysurowic puli H, które mają 3-letni okres przechowywania.

Surowice *E. coli* zostały zbadane po przechowywaniu w temperaturze 37°C przez okres do czterech tygodni. Antysurowice były nadal w pełni sprawne.

Środek konserwujący

Surowice *E. coli* zawierają mniej niż 0,1% azydek sodu (NaN_3) jako środek konserwujący.

Zbieranie próbek i przechowywanie

W przypadku przechowywania próbek należy postępować zgodnie z lokalną standardową procedurą.

Kontrola jakości

Przed użyciem należy sprawdzić fiolkę, aby upewnić się, że nie ma uszkodzeń i/lub wycieków. W przypadku uszkodzenia lub wycieku wyrzucić fiolkę.

Jako kontrolę negatywną stosuje się sól fizjologiczną w celu potwierdzenia, że szczep nie ulega samoaglutynacji.

Procedura

Aglutynacja szkiełkowa z antysurowicami OK O, K9 i F

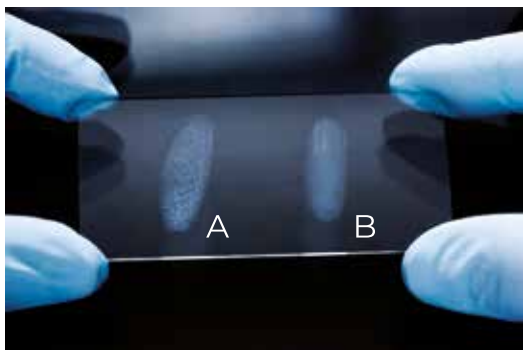
Przygotowywanie materiału testowego

1. Dla antysurowic OK O i K9: *E. coli* jest hodowane przez noc w temperaturze 35–37°C na odpowiednim podłożu.

Dla antysurowic F: *E. coli* jest hodowane przez noc w temperaturze 35–37°C na odpowiednim podłożu agarowym nie hamującym ruchliwości oraz na płytce agarowej Minca IS (surowica F5 może rosnąć tylko na tym specjalnym podłożu).

Przeprowadzanie aglutynacji szkiełkowej:

1. Nanieść małą kroplę surowicy (około 20 μl) na szkiełko szklane.
2. Przenieść hodowlę z 3–5 kolonii do kropli surowicy i dobrze wymieszać. Ilość hodowli powinna być wystarczająca do uzyskania wyraźnego mlecznego zmętnienia. Użyć ezy do zaszczepiania.
3. Przechylać szkiełko przez 5–10 sekund.
4. Reakcję odczytuje się gołym okiem, trzymając szkiełko przed źródłem światła na czarnym tle (oświetlenie pośrednie).
5. Reakcja dodatnia jest widoczna jako aglutynacja. Reakcja negatywna polega na utrzymywaniu się jednorodnego mlecznego zmętnienia. Opóźnioną lub słabą aglutynację (po 10 sekundach) należy uznać za negatywną (patrz rysunek 1).
6. Reakcja pozytywna wskazuje, że jedna z 3–5 hodowli jest pozytywna. Ważne jest, aby zidentyfikować pozytywną hodowlę do dalszych analiz, aby uniknąć pracy z mieszanymi hodowlami.



Rysunek 1. Próbką A jest reakcją pozytywną, a próbką B reakcją negatywną.

Aglutynacja z antysurowicami O

Przygotowywanie materiału testowego

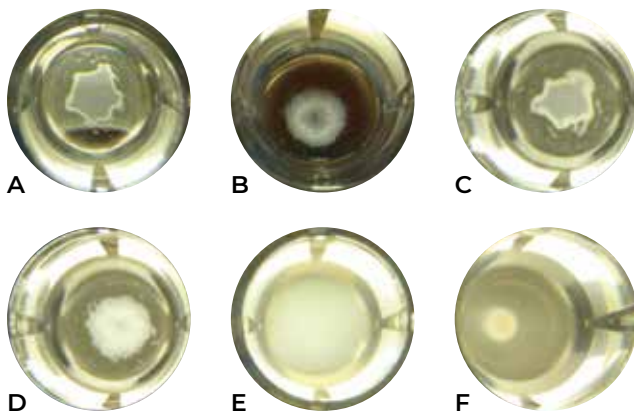
1. Ważne jest, aby użyć bulionu, który nie aglutynuje z antysurowicą, dając fałszywie pozytywne wyniki. Zaleca się przetestowanie bulionu przed użyciem, ponieważ różne buliony różnie aglutynują (patrz rysunek 2).
2. Pozytywną hodowlę z przesiewu OK O lub 3–5 kolonii z nieselektywnej płytki agarowej wybiera się do inokulacji w bulionie infuzyjnym i inkubuje przez noc w temperaturze 35–37°C.
3. Następnego dnia hodowla bulionowa jest gotowana (>90°C) przez 1 godzinę. Po zagotowaniu, hodowlę należy pozostawić na stole przez 1 godzinę, aby umożliwić sedymentację. Ugotowane hodowle mogą być przechowywane w temperaturze 2–8°C przez 1 tydzień, ale przed użyciem muszą być ponownie wymieszane poprzez kilkukrotne odwrócenie bulionu do góry dnem i pozostawione na 1 godzinę na stole.

Surowica O o wysokim mianie musi być rozcieńczona przed użyciem. Zalecane rozcieńczenie robocze jest wydrukowane na etykiecie.

Przeprowadzanie serotypowania O

1. Wymieszać 80 µl antysurowicy O z 80 µl ugotowanej hodowli w jednej studziencie płytki do mikromiareczkowania.
2. Przeprowadzić kontrolę negatywną, mieszając 80 µl soli fizjologicznej o pH 7,4 z 80 µl ugotowanej hodowli.
3. Pokrywkę umieszcza się na płytce do mikromiareczkowania, a płytkę zamyka się w torebce foliowej i inkubuje w temperaturze 50–52°C przez noc.

- Następnego dnia odczytuje się reakcję przy sztucznym świetle z czarnym tłem. Przed odczytem reakcji nie wolno wstrząsać płytką do mikromiareczkowania.
- Pozytywna reakcja odczytywana jest jako „szary dywan”, pokrywający dno studzienki. Kiedy reakcja jest negatywna, zawiesina bakterii jest małą, białą plamką umieszczoną na dnie studzienki (patrz rysunek 2).



Rysunek 2. A–E to pozytywne aglutynacje tego samego antygenu i antysurowicy, ale z różnymi bulionami. A: TSB (Tryptone Soya), B: Mueller Hinton, C: Todd Hewitt, D: Infuzja serca mózgu, E: Bulion wołowy. F jest kontrolą negatywną, w której sól fizjologiczna jest mieszana z gotowaną hodowlą bulionu wołowego.

Aglutynacja z antysurowicami H

Przygotowywanie materiału testowego

- Dzień 1: 3–5 kolonii z nieselektywnej płytki agarowej wybiera się do inokulacji w półstałym agarze (około 2–3 cm głębokim) i inkubuje przez noc w temperaturze 35–37°C.
- Dzień 2: za pomocą pipety do przenoszenia przenieść 3–5 kropli hodowli (która urosła najdalej w kierunku dna próbówki) na inny półstały agar i inkubować przez noc w temperaturze 35–37°C.
- Dzień 3: jeśli hodowla osiągnęła dno półstałego agaru, przenieść 3–5 kropli z dna półstałego agaru na odżywczy bulion wołowy za pomocą pipety do przenoszenia i inkubować przez 6 godzin w temperaturze 35–37°C*. Jeśli hodowla nie osiągnęła dna, powtórzyć krok 2. Ogólnie rzecz biorąc, dwa pasaże w półstałym agarze są wystarczające. Sporadycznie pomocne mogą być trzy lub więcej pasaży w półstałym agarze. Rysunek 3 ilustruje mobilność *E. coli* w półstałym agarze.

4. Dodać formaliny do końcowego stężenia 0,5%** w celu utrwalenia antygenów H.
5. Pozostawić na 30 minut przed użyciem.

Stosunek bulionu do formaliny				
ml bulionu	5	10	15	20
ml 37% formaliny	0,07	0,14	0,20	0,27

* Ruchliwość można dodatkowo poprawić, dzięki inkubacji w temperaturze 30–37°C w bębnie obrotowym ustawionym pod kątem 45° przez 5 do 6 godzin.

** Objętość 37% formaliny, którą należy dodać do bulionu, aby uzyskać końcowe stężenie 0,5% formaliny. Należy pamiętać, aby pracować w dygestorium.

Tabela 2. Stosunek bulionu do formaliny w celu osiągnięcia końcowego stężenia 0,5% formaliny

Przeprowadzanie serotypowania H

1. Zmieszać 3 krople (około 180 µl) antysurowicy H z 180 µl hodowli utrwalonej w formalinie w szklanej probówce.
2. Dla kontroli negatywnej zmieszać 3 krople (około 180 µl) soli fizjologicznej pH 7,4 z 180 µl hodowli utrwalonej w formalinie w szklanej probówce.
3. Szklane próbki inkubuje się w wilgotnej atmosferze (łażnia wodna lub inkubator) w temperaturze 50–52°C przez 1½ do 2 godzin (maksymalnie). Podczas wyjmowania probówek nie należy nimi potrząsać ani kołysać.
4. Po bardzo delikatnym przechyleniu probówek reakcje odczytuje się natychmiast przy sztucznym świetle z czarnym tłem (oświetlenie pośrednie). Reakcje znikną w ciągu 2–3 sekund po przechyleniu probówek.
5. Typowe aglutyniny H są luźne i puszyste. Kształt i struktura mogą się jednak zmieniać w zależności od wpływu innych obecnych antygenów.
6. Reakcja negatywna jest widoczna jako mleczne zmętnienie bez aglutynacji.

Należy pamiętać!

Niektóre serotypy H (np. H32) mogą być trudne do serotypowania przy użyciu tradycyjnych testów aglutynacji opisanych powyżej. WHO zatwierdziła i zaleca test ruchliwości do serotypowania z wykorzystaniem antysurowic firmy SSI Diagnostica, gdy tradycyjna aglutynacja sprawia trudności.

Hodowle, co do których istnieje przypuszczenie, że nie są ruchliwe, inkubuje się przez noc w temperaturze pokojowej (18°C) i podhodowuje w półstałym agarze w celu poprawy ruchliwości. Szczep może być określony jako szorstki H tylko wtedy, gdy test na ruchliwość jest negatywny.

Podczas wykonywania testu ruchliwości (przy użyciu mikroskopu), przeciwciała i bakterie są mieszane na szklanym szkiełku. Mieszaninę przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym. Dodatnia aglutynacja pojawia się jako skrzepy w roztworze swobodnie pływających bakterii. Negatywna aglutynacja (brak aglutynacji) pojawia się jako swobodnie pływające bakterie bez skrzepów. Ważne jest, aby użyć równej ilości antygenów i przeciwciał.



Rysunek 3. A) Nieruchliwe *E. coli* (płyn jest czysty). B) Ruchliwe *E. coli*, które wyhodowano prawie do połowy (płyn jest mętny w miejscu, gdzie hodowano). Należy je podhodować do osiągnięcia pełnej ruchliwości, przed serotypowaniem antygeny H. C) W pełni ruchliwe *E. coli*, które wyhodowano w pełni (płyn jest mętny).



Rysunek 4. Pozytywna aglutynacja H

Interpretacja wyników

Aglutynacja szkiełkowa z antysurowicami OK O, K9 i F

Reakcja dodatnia jest widoczna jako aglutynacja, podczas gdy reakcja negatywna jest utrzymuje się na jednorodnym mlecznym zmętnieniu (patrz rysunek 1). Nie należy interpretować wyników po 10 sekundach, ponieważ żadna reakcja widoczna po 10 sekundach nie może być uznana za prawdziwy wynik pozytywny.

Aglutynacja z antysurowicami O

Reakcja dodatnia odczytywana jest jako „szary dywan”, pokrywający dno studzienki, podczas gdy reakcja ujemna odczytywana jest jako mała biała plamka, znajdująca się na dnie studzienki (patrz rysunek 2).

Aglutynacja z antysurowicami H

Typowe aglutyniny H są luźne i puszyste. Kształt i struktura mogą się jednak zmieniać w zależności od wpływu innych obecnych antygenów. Reakcja negatywna jest widoczna jako mleczne zmętnienie bez aglutynacji (patrz rysunek 3 i 4).

Utylizacja

Należy przestrzegać lokalnych procedur i/lub krajowych wytycznych dotyczących utylizacji materiałów biologicznych.

Ograniczenia

- Hodowla musi być potwierdzona jako *E. coli* przed określeniem serotypu przy użyciu antybiotyków firmy SSI Diagnostica.
- Antybiotyki mogą być stosowane wyłącznie w sposób opisany w niniejszej instrukcji użycia.

Wydajność

Czułość, swoistość i powtarzalność

<i>Ogólne wyniki antybiotyków E. coli</i>		
	Odsetek (liczba pozytywnych/ rzeczywiście pozytywnych)	95% przedział ufności
Czułość	99% (234/236)	97–100
Swoistość	98% (334/340)	96–99
Powtarzalność	99% (862/870)	98–100

Tabela 3. Czułość, swoistość i powtarzalność

Odtwarzalność

Odtwarzalność w obrębie różnych grup antybiotyków i wszystkich antybiotyków łącznie wynosi 97,47% (95,25%–98,66%). Dlatego wszystkie produkowane antybiotyki mają wysoki poziom odtwarzalności w czasie i serii.

Zgłaszanie incydentów

Każdy poważny incydent, który miał miejsce w związku z wyrobem, należy zgłosić wytwórcy i właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym użytkownik i/lub pacjent ma siedzibę.

Certyfikat jakości

Rozwój, produkcja i sprzedaż diagnostyki *in vitro* przez firmę SSI Diagnostica są zapewnione pod względem jakości i certyfikowane zgodnie z ISO 13485. Certyfikat analizy można pobrać z naszej strony internetowej: ssidiagnostica.com



Quality System
DS/EN
ISO 13485



REF

[Lista produktów i skład znajdują się na naszej stronie internetowej:](http://ssidiagnostica.com/nordic/solutions/antiseras/e-coli-antiseras/)
- <https://ssidiagnostica.com/nordic/solutions/antiseras/e-coli-antiseras/>



Piśmiennictwo

1. Ørskov *et al.*, Bacteriol Rev. 1977 september; 41(3):667-710.

Informacje i zamawianie

SSI Diagnostica A/S
Herredsvejen 2
3400 Hillerød
Tel. +45 4829 9100
info@ssidiagnostica.com
www.ssidiagnostica.com
shop.ssidiagnostica.com

SSI Diagnostica A/S
Herredsvejen 2
3400 Hillerød
Denmark

ssidiagnostica.com

Improving
Microbiology