

## **Gruber-Widal Anti-Coli O 1 a Anti-Coli O 2 séra**



Pro konfirmační test

Informace pro kvalifikované pracovníky

### **Obvyklé použití**

Testovací séra jsou určena pro použití při sérologické confirmaci izolátů *E. coli*, které reagovaly pozitivně na anti-Coli O 1 a/nebo O 2 testovací séra, pomocí sklíčkové aglutinace.

### **Princip testu**

Považený kmen *E.coli* se titruje s testovacím sérem o známém titru a v případě positivity reaguje až do dosažení homologického titru ( $\pm$  jeden stupeň titru).

### **Složení**

Testovací séra jsou absorbovaná séra z imunizovaných králíků.

Konzervans: azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ) 0.9 mg/ml

Testovací séra jsou lyofilizována a musí se před použitím rozpustit v 1 ml destilované vody a dobře uzavřít přiloženou pipetou.

### **Exspirace a podmínky skladování**

Pokud skladujeme neotevřené balení testovacích sér při teplotě 2-8 °C, mohou být používány až do data uvedeného na obalu. Jednou otevřená a rozpuštěná séra skladovaná při 2-8 °C, zůstávají použitelné nejméně 18 měsíců, ale 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**

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 *E. coli* je až do inaktivace živým patogenem, musí se dodržovat všechny nezbytné ochranné pracovní postupy (nebezpečí infekce)!

### **Materiál a zařízení, které není součástí tohoto balení**

Destilovaná voda, fyziologický roztok (NaCl), zkumavky nebo mikrotitrační destičky (U dno), pipety, pipetovací špičky, vodní lázeň a inkubátor.

### **Testovaný materiál a metodika**

Kmen *E. coli*, který se má sérologicky potvrdit, je nanesen na kultivační médium s nízkou selektivitou a inkubován přibližně 16-20 hodin při pokojové teplotě (18- 26 °C). Bakterie jsou spláchnuty pomocí NaCl a povařeny po dobu 1 hodiny kvůli zničení termolabilních K antigenů. Bakteriální suspenze je poté adjustována s použitím NaCl na koncentraci buněk asi  $10^9$  bakterií/ml (McFarland Standard č. 3) a použije se jako antigenní suspenze. Gruber-Widal test lze provést ve zkumavce nebo na mikrotitrační destičce.

### 1. Gruber Widal test (ve zkumavkách)

Připravte si sérii ředění homologního testovacího séra ve fyziologickém roztoku v postupné geometrické řadě s faktorem ředění 2 a začněte ředěním 1:25 (např. 50 µl reagensie + 1,2 ml NaCl). Nejprve přidejte 0,5 ml NaCl do každé zkumavky. Potom s použitím pipety přidejte 0,5 ml předředěné (1:25) reagensie 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 1:100. Uzavřete zkumavky a inkubujte ve vodní lázni nebo inkubátoru po dobu 16-20 hodin při 50 °C.

### 2. Gruber-Widal test (mikrotitrační destička)

Připravte si sérii ředění homologního testovacího séra 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 µl reagensie + 1,2 ml NaCl). Nejprve přidejte 50 µl NaCl do každé do každé jamky jednoho ředění (jamky A-H). Potom s použitím pipety přidejte 50 µl předředěné (1:25) protilátky do první jamky. Dobře promíchejte a přepipetujte 50 µl z první jamky do druhé. Dobře promíchejte a analogicky pokračujte až k poslední jamce. Z poslední jamky po promíchání odpipetujte 50 µl a zlikvidujte. Potom přidejte 50 µl antigenní suspenze ke každému ředění testovacího séra, 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.

### 3. Kontrola kvality

#### 3.1 Pozitivní kontrola

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

#### 3.2 Negativní kontrola

##### Kontroly testovací séra

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

##### Kontrola antigenu

Místo reagensie 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 testovací sérum použité v testu až k O-titru deklarovanému na lahvičce (odchylky 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: červen 2008

Datum překladu: srpen 2013

### **Výrobce:**

SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin

Berliner Allee 317/321

13088 Berlin

Germany

[www.sifin.de](http://www.sifin.de)

### **Zplnomocněný zástupce výrobce v České republice:**

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Tůmova 2265/60, 616 00 Brno

IČ: 634 71 507, DIČ: CZ63471507