

SOLUS *E. COLI* O157 ELISA

Sistema de Testes Baseados em Imunoensaio para
a Detecção de *E. coli* O157
em Amostras Ambientais e de Alimentos

Número do folheto informativo: 38
Número de emissão: 2.0
Data de emissão: Abril de 2020
Código(s) do produto: EC-048S
Organismo de certificação: AFNOR





SOL 37/03-10/15
MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Este método está certificado pela AFNOR para a deteção de *E. coli* O157, incluindo H7, em produtos de carne bovina crua (temperada ou não), leite cru e produtos lácteos, legumes e amostras ambientais (n.º de ref. de validação **SOL 37/03-10/15**).

1. INTRODUÇÃO

O Solus *E. coli* O157 ELISA proporciona um resultado negativo ou presumivelmente positivo de um único enriquecimento no período de 18 a 22 horas, incluindo a duração do ensaio.

2. FINALIDADE

O Solus *E. coli* O157 ELISA é utilizado para a detecção de *E. coli* O157 em amostras ambientais da produção e de alimentos selecionados. O método de ensaio é fácil de realizar, mas requer instalações laboratoriais e pessoal com qualificação e formação adequada. Para aqueles que o utilizem pela primeira vez, recomenda-se que obtenham uma formação básica fornecida pela Solus Scientific Solutions Ltd.

A utilização do método inclui o cumprimento das boas práticas de laboratório (consulte a EN ISO 7218).

3. REAGENTES FORNECIDOS

A maioria dos componentes do kit são fornecidos estabilizados e prontos para utilizar na concentração de atuação, com o concentrado de tampão de lavagem a ser o único que requer diluição. Cada kit possui material suficiente para 1 x 93 determinações, além dos controlos. A data de validade do kit encontra-se no rótulo de cada produto.

Componente	Aspeto	Volume	Comentários
Placa de ensaio	Microplaca de 96 poços com formato de tira amovível	1	Poços revestidos com anticorpos contra <i>E. coli</i> O157
Controlo negativo	Líquido incolor/claro. Rótulo verde.	3 ml	Concentração de atuação. Contém diluente com conservante.
Controlo positivo	Líquido preto. Rótulo vermelho.	3 ml	Concentração de atuação. Contém <i>E. coli</i> O157 inativada pelo calor com conservante.
Conjugado	Líquido incolor/de cor palha muito pálida. Rótulo laranja.	11 ml	Concentração de atuação. Contém conjugado de anticorpo de peroxidase de rábano em diluente com conservante.
Substrato	Líquido incolor/azul muito pálido. Rótulo azul.	11 ml	Concentração de atuação. Contém 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrogénio e estabilizadores.
Solução de paragem	Líquido incolor. Rótulo amarelo.	11 ml	Concentração de atuação. Contém 0,2 M de ácido sulfúrico.
Concentrado de tampão de lavagem	Líquido incolor/amarelo/laranja. Rótulo branco.	10 ml x 6	Concentrado. Diluir antes de utilizar.
Filtros de vidro sinterizado	Discos de plástico brancos planos aprox. 12 mm de diâmetro	100	Os filtros de vidro sinterizado devem ser aplicados a cada tubo de amostra após o tratamento por calor, assim que a amostra voltar à temperatura ambiente (18-25 °C). Consulte os pormenores na secção 7.

4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS QUE NÃO SÃO FORNECIDOS

Frigorífico a 2-8 °C	Temporizador
Água desionizada ou destilada (DI)	Incubadora a 37±1 °C
Caldo de triptona de soja modificado + novobiocina (20 mg/L)	Incubadora a 41,5±1 °C
Provetas graduadas para diversos volumes (p. ex., 250 ml, 1 L)	Aparelho para aquecimento (p. ex., incubadora de calor) com capacidade para aquecer a 85-100 °C
Tubos de ensaio esterilizados de 10 ml adequados para enriquecimento seletivo	
Homogeneizador (ou aparelho similar) e bolsas de filtro	Pipetas e pontas (1 ml; 0,1 ml)
Pipetas de transferência de 3 ml (esterilizadas)	Dynex DS2 ou lavadora de microplacas e leitor de microplacas com filtro de 450 nm
Agitador vórtex	
Tubos para ebulição de amostras (p. ex., tubos sem aro de 5 ml de polipropileno, 12x75 mm)	Autoclave para descontaminação de amostras

5. PREPARAÇÃO DE REAGENTES

5.1 Tampão de lavagem:

Adicione os conteúdos de uma garrafa de tampão de lavagem (10 ml) em 240 ml de água desionizada para preparar o tampão de lavagem na concentração da amostra. Transfira e rotule conforme adequado. A solução preparada pode ser armazenada durante um máximo de 4 semanas se for mantida a 2-8 °C.

5.2 Caldo de cultura (meio de crescimento):

Prepare o caldo de triptona de soja modificado de acordo com as instruções do fabricante. Deixe arrefecer até à temperatura ambiente (18-30 °C) antes de adicionar complemento de novobiocina a 20 mg/L (mTSBn).

6. PREPARAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE AMOSTRAS - método padrão

Homogeneíze 25 g da amostra a testar, se necessário por homogeneizador, em 225 ml de caldo de triptona de soja modificado (mTSB) + novobiocina (20 mg/L) e incube durante 16-20 horas a 41,5±1 °C. No contexto da NF VALIDATION, não foram testadas tomas de ensaio com um peso superior a 25 g.

7. INATIVAÇÃO PELO CALOR APÓS ENRIQUECIMENTO

- 7.1. Quando o período de incubação da amostra estiver concluído, transfira 1-2 ml de alíquota (evitando as partículas) para um tubo para ebulição da amostra (p. ex., tubo de polipropileno de 5 ml).
- 7.2. Aqueça a alíquota a 85-100 °C durante 15-20 minutos no tubo. Após o aquecimento, deixe a amostra arrefecer até à temperatura ambiente (18-30 °C). Isto poderá ser acelerado ao colocar os tubos sob água fria da torneira durante aprox. 5 minutos.
- 7.3. Para evitar problemas de pipetagem, principalmente no instrumento Dynex DS2, adicione um filtro de vidro sinterizado diretamente em cada tubo de amostra e pressione ligeiramente para permitir a pipetagem de uma amostra relativamente clara acima do nível do vidro sinterizado.

NOTA - O vidro sinterizado apenas deve ser introduzido após a fase de aquecimento, e assim que o tubo voltar à temperatura ambiente (18-30 °C).

As amostras não inativadas pelo calor devem ser preservadas para verificação até à obtenção dos resultados do teste ELISA. Estas amostras devem ser mantidas a $41,5 \pm 1$ °C se o teste ELISA for realizado no prazo de 2 horas. Se isto não for possível, mantenha os caldos durante um período de até 72 horas a 2-8 °C antes do teste ELISA.

8. PROCEDIMENTO DE ENSAIO ELISA

- 8.1. Retire o kit de teste do local de armazenamento, pelo menos, uma hora antes de o utilizar para permitir que os componentes atinjam a temperatura ambiente (18-30 °C). Determine o número de poços necessários para o teste. Retire a quantidade necessária de tiras da bolsa e coloque-as no suporte fornecido. As tiras não utilizadas devem ser colocadas novamente na bolsa e armazenadas a 2-8 °C.
- 8.2. Prepare o tampão de lavagem conforme detalhado na secção 5.1.
- 8.3. Deixe o primeiro poço na tira vazio para ser utilizado como um "espaço vazio" para a medição da absorvância do substrato.
- 8.4. Pipete 0,1 ml de controlo negativo (rótulo verde) no segundo poço.
- 8.5. Pipete 0,1 ml de controlo positivo (rótulo vermelho) no terceiro poço.
- 8.6. Pipete 0,1 ml de cada amostra inativada pelo calor de forma separada em poços consecutivos na tira. Se sobram poços no final de uma tira de teste, os controlos positivos ou negativos poderão ser repetidos. †
- 8.7. Incube a placa (que tenha as tiras) a 37 ± 1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.8. Após a incubação, aspire os conteúdos dos poços, removendo a maior quantidade possível de líquido. Lave os poços 5 vezes com tampão de lavagem, garantindo o enchimento e esvaziamento completo dos poços em cada ciclo de lavagem. A técnica de lavagem é fundamental para a execução do ensaio e, por conseguinte, recomenda-se a utilização de um instrumento de lavagem de microplacas.
- 8.9. Pipete 0,1 ml de conjugado (rótulo laranja) em todos os poços, salvo no que é utilizado como "espaço vazio".
- 8.10. Incube a placa a 37 ± 1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.11. Repita os ciclos de lavagem conforme detalhado na secção 8.8
- 8.12. Pipete 0,1 ml de substrato (rótulo azul) em todos os poços, incluindo o poço que é utilizado como "espaço vazio".
- 8.13. Incube a placa à temperatura ambiente (18-30 °C) durante 10 minutos no escuro.
- 8.14. Após a incubação, pare a reação ao adicionar 0,1 ml de solução de paragem (rótulo amarelo) em todos os poços, incluindo o poço que é utilizado como "espaço vazio". A solução de paragem fará com que qualquer cor azul nos poços mude para amarelo.
- 8.15. Leia as densidades óticas dos poços em 10 minutos num leitor de placas com um filtro de 450 nm. Antes da leitura, inspecione se existem bolhas de ar nos poços e, se houver, rebente-as com uma agulha. O leitor deve ser colocado a zeros através do poço utilizado como "espaço vazio" antes da leitura dos outros poços. Não utilize o filtro de referência. É preferível utilizar equipamento automático ELISA que deve ser configurado e validado de acordo com este protocolo.

† Se utilizar o instrumento Dynex, deve tomar cuidado para impedir o surgimento de bolhas na amostra e nos tubos de reagente, ou a formação de camadas ao longo do tubo acima do nível do líquido. Antes de avançar, é fundamental confirmar se o sistema pipetou com sucesso amostras para a placa de ensaio.

9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são apresentados como medições de densidade ótica (DO_{450}) através de um leitor de microplacas.

Critérios de aceitação:

Controlo negativo DO_{450}	< 0,100
Controlo positivo DO_{450}	> 0,500

O valor do poço vazio (normalmente o A1 quando o processamento é realizado manualmente) deve ser sempre subtraído. Se o valor dos controlos negativo ou positivo não cumprir estes critérios, o teste não será considerado válido e terá de ser realizado novamente.

As amostras com leituras de $DO_{450} < 0,200$ são consideradas negativas, sendo que neste caso a análise está concluída, os resultados poderão ser comunicados e as respetivas amostras não inativadas pelo calor poderão ser eliminadas de acordo com os regulamentos/diretrizes locais.

Os poços da amostra com $DO_{450} \geq 0,200$ são considerados presumivelmente positivos quanto a *E. coli* O157. Os resultados presumivelmente positivos têm de ser verificados através de um método de cultura reconhecido.

10. CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS POSITIVOS DO *E. COLI* O157 ELISA

No contexto da NF VALIDATION, todas as amostras identificadas como positivas pelo método alternativo têm de ser confirmadas por um dos seguintes testes:

- Ao utilizar os testes convencionais descritos nos métodos normalizados pela CEN ou ISO. A etapa de confirmação tem de começar pelo caldo de mTSB+n não inativado pelo calor armazenado a 41,5 °C ou 2-8 °C. (Consulte a ISO 16654:2001 - *Horizontal method for the detection of Escherichia coli* O157).
- Utilize a técnica de riscado com mTSB+n (10µL) numa placa de ágar cromogénico (tal como CHROMagar O157) e CT-SMAC e incube as placas a 37 °C±1 °C durante 18-24 horas. Realize uma identificação serológica de colónias características, com ou sem uma etapa de purificação, ao utilizar um teste de látex O157 (Microgen *E. coli* O157 M44) e depois de uma etapa de purificação ao utilizar o teste de látex H7 (Wellcolex *E. coli* O157:H7 R30959601).

No caso de haver resultados discordantes (resultados presumivelmente positivos do teste ELISA e um resultado de cultura negativo), tem de ser utilizado uma etapa de IMS como uma etapa de confirmação ao obter 1 ml de mTSB+n (não aquecido) e seguir o método conforme descrito na ISO 16654:2001 antes de utilizar a técnica de riscado com partículas magnéticas em ambas as placas de ágar. Este método é mais sensível do que a cultura direta em placas e pode ajudar a confirmar as amostras que contêm níveis inferiores do organismo-alvo.

No caso de haver resultados discordantes (o resultado presumivelmente positivo do teste ELISA não confirmado por um dos meios supramencionados e, em particular, os testes de látex), o laboratório tem de seguir os passos necessários para garantir a validade do resultado obtido.

11. ARMAZENAMENTO E VALIDADE DO KIT

O kit e quaisquer componentes não utilizados do kit devem ser armazenados a 2-8 °C. **NÃO CONGELAR**. A data de validade do kit está indicada na caixa do kit, assim como em todos os componentes do kit que se encontram no interior da caixa. Qualquer tampão de lavagem diluído não utilizado pode ser armazenado ao longo de até 4 semanas se for mantido a 2-8 °C. Quaisquer tiras de microplacas não utilizadas devem ser colocadas novamente na bolsa de alumínio com a saqueta de dessecante e o fecho hermético completamente fechados e, depois, armazenadas a uma temperatura de 2-8 °C.

12. SEGURANÇA

Embora os procedimentos apresentados sejam simples e fáceis de realizar, requerem instalações laboratoriais com pessoal qualificado com formação para o manuseamento de organismos potencialmente patogénicos. Para aqueles que o utilizem pela primeira vez, recomenda-se que obtenham uma formação fornecida pela Solus Scientific Solutions Ltd.

- A solução de paragem contém ácido sulfúrico, o qual é corrosivo. Lave imediatamente com água em abundância se a solução entrar em contacto com a pele ou mucosas.

Como orientação, devem ser tomadas pelo menos as seguintes precauções:

- Deve ser usado vestuário de proteção, incluindo bata de laboratório, óculos de proteção, máscara e luvas, conforme adequado.
- Não pipetar com a boca.
- Evitar o contacto com a pele.
- Não comer, beber nem aplicar cosméticos no laboratório.
- Seguir todos os regulamentos locais, estatais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis quanto à eliminação de resíduos biológicos.

13. PRECAUÇÕES

- Os reagentes são fornecidos com uma concentração de atuação fixa. Haverá uma redução da excelente sensibilidade e especificidade se os reagentes forem modificados ou não forem armazenados sob as condições recomendadas.
- Não misture diferentes lotes de reagentes.
- Evite a contaminação microbiana das garrafas de reagente abertas.
- Certifique-se de que não ocorre contaminação cruzada entre os poços.
- Para a realização correta do teste é fundamental não permitir que o anticorpo conjugado com enzima contamine outros reagentes e equipamento.
- Certifique-se de que os componentes do kit não são expostos a temperaturas superiores a 40 °C.
- Não devem ser utilizadas soluções que contenham azida de sódio para a limpeza do equipamento, principalmente dispositivos de lavagem (a enzima peroxidase utilizada no kit é inativada pela azida de sódio).
- Não utilize para fins de diagnóstico de amostras médicas.

14. INFORMAÇÃO DAS MSDS

Existem fichas de dados de segurança (MSDS) relativas a este teste disponíveis mediante pedido.

15. GARANTIA

A precisão dos resultados depende da utilização do kit de forma correta e com cuidado de acordo com as instruções de utilização. Se o desempenho do kit não estiver de acordo com as especificações, entre em contacto com:

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre
Millennium Business Park
Concorde Way
Mansfield
Nottinghamshire
NG19 7JZ

Tel. - +44 (0)1623 429701

Fax - +44 (0)1623 620977

Email: info@solusscientific.com

Informação de direitos de autor

O presente documento, incluindo todas as fotografias e ilustrações, contém informações exclusivas que se encontram protegidas por direitos de autor. Nenhuma parte da presente publicação pode ser de alguma forma reproduzida ou traduzida para qualquer idioma sem a autorização prévia por escrito da PerkinElmer. ©2020 PerkinElmer, Inc. Todos os direitos reservados.

Marcas comerciais

A PerkinElmer é uma marca comercial registada da PerkinElmer, Inc. Todas as outras marcas comerciais são da propriedade dos respetivos proprietários.

Resumo de alterações

Data da alteração	Número de emissão	Resumo da alteração
Jan2020	1	Reformulação de Solus E.coli O157 ELISA – QCF49 – Emissão 1.3 – 07/16.
Abr2020	2	Adição de corante preto no controlo positivo e inclusão de filtros de vidro sinterizado no kit de ensaio.

NOTA: As pequenas alterações (p. ex., formatação, gramática, correção de erros tipográficos) não estão incluídas no resumo de alterações.

Para obter mais informações, visite www.solusscientific.com

Fabricado em:

Solus Scientific Solutions Ltd.

9 Mansfield Networkcentre,
Millennium Business Park, Concorde Way,
Mansfield, Nottinghamshire
NG19 7JZ
Reino Unido
Tel. - +44 (0)1623 429701

PerkinElmer, Inc

940 Winter Street,
Waltham, MA 02451 EUA
T: (800) 762-4000 ou
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



Para obter uma lista completa dos nossos escritórios globais, visite www.perkinelmer.com/ContactUs