



## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

**O157 E. COLI CARD**TESTE IMUNOCROMATOGRAFICO RÁPIDO PARA A DETEÇÃO QUALITATIVA DE *E. COLI* O157 EM AMOSTRAS DE FEZES HUMANAS, DE ALIMENTOS E EM COLÓNIAS SUSPEITAS**1 - SIGNIFICADO CLÍNICO E utilização PRETENDIDA**Apenas para diagnóstico *in vitro*

A infecção com *Escherichia coli* O157:H7 (*Escherichia coli* enterohemorrágica, EHEC) apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo portador assintomático, diarreia não sanguínea, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico (HUS) e púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). Não só a *Escherichia coli* O157:H7 é um agente importante para a colite hemorrágica, como também é uma das principais causas de diarreia bacteriana.

A transmissão de *Escherichia coli* O157:H7 é principalmente de origem alimentar. A carne mal cozinhada é o culpado mais comum, os produtos lácteos e a propagação secundária de pessoa para pessoa são também importantes. O organismo produz pelo menos duas toxinas semelhantes a Shiga. Pensa-se que estas toxinas têm um significado patogénico direto na infecção por *Escherichia coli* O157:H7. Esta infecção é geralmente diagnosticada a partir de uma cultura positiva de fezes, a partir da presença de toxinas Shiga, ou ambas. A recolha atempada (dentro de 7 dias após o início da doença) de uma amostra de fezes para cultura é indispensável para uma alta taxa de recuperação.

O O157 E. COLI CARD é um teste imunocromatográfico rápido manual para a deteção qualitativa de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos e em amostras de fezes humanas, para auxiliar no diagnóstico de infeções por *E. coli*. É possível detetar a *E. coli* O157:H7 a partir de colónias suspeitas em cultura de fezes. O teste oferece um ensaio de rastreio simples e altamente sensível para fazer um diagnóstico presuntivo da infecção por *Escherichia coli* O157:H7 e pode ser utilizado para identificar isolados suspeitos de *E. coli* O157:H7 a partir de meios seletivos.

**2 - PRINCÍPIO DO MÉTODO**

O O157 E. COLI CARD é um método imunocromatográfico não invasivo, simples de executar, rápido e muito preciso para a determinação de *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de alimentos, de fezes e em colónias suspeitas de *E. coli* O157:H7 em cultura de fezes.

A tira consiste numa membrana de nitrocelulose pré-revestida com anticorpos na linha de teste (T), na janela de resultados, contra *Escherichia coli* O157:H7 e com anticorpos policlonais de coelho na linha de controlo (C), contra uma proteína específica. O poço da amostra absorvente é pulverizado com solução de teste (anticorpos anti-*Escherichia coli* O157:H7) conjugada com látex de poliestireno vermelho e solução de controlo (proteína de ligação específica) conjugada com látex de poliestireno verde, formando complexos conjugados coloridos.

Se a amostra for positiva para *Escherichia coli* O157:H7, os antígenos da amostra diluída reagem com o complexo conjugado de cor vermelha (microesferas de poliestireno vermelho anti-*Escherichia coli* O157:H7) que foi previamente pré-seco no poço absorvente. A mistura move-se então para cima sobre a membrana por ação capilar. À medida que a amostra flui através da membrana de teste, os complexos conjugados de ligação migram. Os anticorpos anti-*Escherichia coli* O157:H7 presentes na membrana (linha de teste) capturam o conjugado colorido e a linha vermelha será visível. Esta banda é utilizada para interpretar o resultado.

Se a amostra for negativa, não há presença do antígeno *Escherichia coli* O157:H7 e ainda assim, os antígenos podem estar presentes numa concentração inferior ao valor limite de deteção, para o qual a reação não terá lugar com o complexo conjugado de cor vermelha. Os anticorpos anti-*Escherichia coli* O157:H7 presentes na membrana (linha de teste) não capturarão o complexo conjugado de cor vermelha do antígeno (não formado), razão pela qual a linha vermelha não aparecerá. Quer a amostra seja positiva ou não, a mistura continua a mover-se através da membrana para os anticorpos específicos imobilizados colocados na linha de controlo. Os anticorpos proteicos específicos presentes na membrana irão capturar o complexo conjugado verde de controlo e a linha de controlo irá aparecer sempre. A presença desta linha verde serve como: 1) verificação de que é adicionado volume suficiente, 2) que é obtido um fluxo adequado e 3) um controlo interno para os reagentes.

**3 - MATERIAIS FORNECIDOS - EMBALAGEM**

Produto	Tipo	REF.	Conteúdo
O157 E. COLI CARD CND: W0105011501; EDMA: 15.01.15.01; RDM: 1465288/R	Teste imunocromatográfico	VC1010 (25 testes)	25 cassetes num invólucro de alumínio selado, com exsicante. 1 frasco de plástico com ponta conta-gotas contendo o líquido de extração (1 x 20 mL). 5 pipetas de plástico. Embalagem secundária: caixa de cartão.

**4 - MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**

Recipiente de recolha de amostras, tubos para teste, luvas descartáveis, cronómetro, estufas +37°C ± 1°C e água purificada.

Meio enriquecido para O157 E. COLI: ECBroth (Ref. Biolife 551425), Bagmixer 1 (Ref. Biolife 7221230), Sorbitol MacConkey Agar (Biolife Ref. 5416695).

**5 - PRECAUÇÕES E AVISOS**

- Todas as operações ligadas à utilização do teste devem ser realizadas em conformidade com as Boas Práticas de Laboratório.
- O157 E. COLI CARD é um kit qualitativo apenas para diagnóstico *in vitro*, para uso profissional; deve ser utilizado por pessoal de laboratório adequadamente treinado e qualificado.
- Este produto não é classificado como perigoso de acordo com a legislação em vigor.
- Evitar tocar com os dedos na membrana de nitrocelulose.
- Todas as amostras devem ser consideradas potencialmente perigosas e manuseadas da mesma forma que um agente infeccioso.
- Cada cassete de teste é apenas para uso único.
- Nunca utilizar reagentes de outro lote.
- O teste deve permanecer no invólucro selado até à sua utilização, e o teste deve ser realizado no prazo de 2 horas após a abertura do invólucro selado.
- Não utilizar o teste se o invólucro estiver danificado.
- A presença de linhas amarelas na janela de resultados (zona de linha de controlo e de teste) que são visíveis antes da utilização do teste são completamente normais. Isto não significa falha na funcionalidade do teste.
- Usar luvas ao manusear a amostra.
- Colocar as luvas descartáveis, tampão de extração, tubos de ensaio, e dispositivos usados num recipiente de risco biológico próprio.
- A qualidade dos reagentes não pode ser garantida depois da sua data de validade ou se os reagentes forem armazenados em condições inadequadas.
- Os Certificados de Análise e a Ficha de Dados de Segurança do produto estão disponíveis no website.
- Se o dispositivo contiver matérias-primas de origem animal, a matéria-prima utilizada é derivada de animais que foram abatidos num matadouro autorizado e, na sequência de uma inspeção *antemortem*, que não mostraram qualquer sinal de doença transmissível a seres humanos ou animais. Em qualquer caso,





recomenda-se que o kit seja tratado como potencialmente infeccioso, e manuseado observando as precauções específicas habituais: não ingerir, inalar, ou deixar entrar em contacto com a pele, olhos, membranas mucosas.

- As informações fornecidas neste documento foram definidas com o melhor dos nossos conhecimentos e capacidades e representam uma orientação para a utilização adequada do produto, mas sem obrigação ou responsabilidade. Em todo o caso, o utilizador final deve respeitar as leis, regulamentos e procedimentos locais para o teste de amostras colhidas de diferentes origens humanas e animais, amostras ambientais e para produtos destinados ao consumo humano ou animal. As nossas informações não isentam os nossos clientes da sua responsabilidade de verificar a adequação do nosso produto para o fim pretendido.
- Notificar a Mascia Brunelli Spa e as autoridades competentes de quaisquer incidentes graves que ocorram relacionados com o dispositivo de diagnóstico *in vitro*. [complaint@masciabrunelli.it](mailto:complaint@masciabrunelli.it).

#### 6 - CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Após receção, armazenar o kit na sua embalagem original à temperatura refrigerada ou ambiente (2-30°C/36-89°F). Se for devidamente armazenado, o kit pode ser utilizado até ao fim da data de validade. A cassete de teste deve permanecer no invólucro selado até à sua utilização. Não utilizar a cassete de teste após 2 horas de abertura do invólucro selado. Não congelar.

#### 7 - COLHEITA DE AMOSTRAS E PROCEDIMENTO PARA AMOSTRAS DE FEZES

**Amostras fecais:** As amostras de fezes devem ser colhidas em recipientes limpos e secos. As amostras podem ser armazenadas no frigorífico (2-8°C) durante **1-2 dias** antes de serem testadas. Para períodos mais longos, máximo de **1 ano**, a amostra deve ser mantida congelada a -20°C. Neste caso, a amostra será totalmente descongelada e deixada a atingir a temperatura ambiente antes de ser testada. Homogeneizar a amostra de fezes e proceder à preparação assim que possível. Os ciclos de congelação e descongelação não são recomendados.

##### Preparação das amostras

Utilizar uma zaragatoa ou vareta, conta-gotas e tubo ou frasco de teste em separado para cada amostra. Dispensar 0,7 mL (ou 14 gotas) do tampão de extração para um tubo de teste. Recolher a amostra de fezes com uma vareta, mergulhando em *quatro* locais diferentes da mesma amostra de fezes. Transferir uma pequena porção de fezes (aprox. 125 mg). Colocar a vareta no tubo de ensaio de plástico. Agitar o tubo de extração a fim de obter uma solução homogénea. Repetir as operações apenas se necessário para obter uma solução castanha-amarelada escura.

A transferência de fezes demasiado pequenas, ou a não mistura e suspensão total das fezes no tubo de extração pode resultar num resultado de teste falso-negativo. Deve ter-se o cuidado de transferir não menos e não mais do que a quantidade indicada. A amostra deve ser completamente misturada num vórtex antes de ser testada. A adição de uma quantidade excessiva de fezes pode causar resultados inválidos devido à restrição do fluxo da amostra. Para **amostras líquidas ou semi-sólidas**, utilizando uma pipeta em separado, retirar as fezes da própria amostra. Distribuir aproximadamente 125 µL de cada amostra de fezes num tubo de ensaio contendo o tampão de extração (0,7 mL ou 14 gotas). Fechar o tubo com o diluente e a amostra de fezes. Agitar o tubo de modo a assegurar uma boa dispersão da amostra.

##### Procedimento do teste

**Deixar que os testes, amostras de fezes e tampão atinjam a temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F) antes de serem testados. Não abrir os invólucros até estar tudo pronto para realizar o teste.**

1. Retirar a cassete de teste do invólucro de proteção. Identificar a cassete de plástico com os dados do doente.
2. Utilizar uma cassete em separado para cada amostra. Pipetar algum líquido da parte superior do tubo contendo a amostra e o líquido de extração.
3. Dispensar 4 gotas no poço da amostra. Iniciar o cronómetro.
4. Ler o resultado 10 minutos após a distribuição da amostra. Não exceder os 10 minutos.

Se o teste não correr devido a partículas sólidas, agitar a amostra adicionada na janela da amostra (S) com a vareta. Se não funcionar, dispensar uma gota de diluente até ver o líquido a correr através da zona de reação.

#### 8 - COLHEITA DE AMOSTRAS E PROCEDIMENTO PARA AMOSTRAS ALIMENTARES

As amostras de alimentos devem ser colhidas em recipientes limpos e o teste deve ser feito logo após a colheita. As amostras podem ser armazenadas no frigorífico (2-4°C) durante 1-2 dias antes de serem testadas. Para um armazenamento prolongado, a amostra deve ser mantida congelada a -20°C. Neste caso, a amostra será totalmente descongelada e deixada atingir a temperatura ambiente antes de ser testada. Assegurar que apenas a quantidade necessária é descongelada devido aos ciclos de congelação e descongelação não são recomendados. Homogeneizar completamente a amostra antes da preparação.

##### Enriquecimento da amostra:

Misturar 25 g de amostra sólida ou 25 mL de amostra líquida com 225 mL de meio de enriquecimento. Meio de enriquecimento: ECBroth, se necessário, homogeneizar com um homogeneizador durante 2 min. (Bagmixer 1).

Incubar durante 18-24 horas a 37°C ± 1°C.

##### Procedimento de teste

**Deixar que os testes, amostras e tampão atinjam a temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F) antes de serem testados. Não abrir os invólucros até estar tudo pronto para realizar o teste.**

1. Colocar 1 ou 2 mL de amostras de enriquecimento num tubo de ensaio e tapá-lo. Deixar à temperatura ambiente apenas o número de testes necessários para a realização do ensaio antes de os abrir.
2. Utilizar uma cassete para cada amostra em separado. Pipetar algum líquido da parte superior e distribuir 150 µL para o poço da amostra. Iniciar o cronómetro.
3. Ler o resultado 5 minutos após a distribuição da amostra.

#### 8 – PROCEDIMENTO PARA CULTURA EM PLACA

**Suspeita de colónias de *E. coli* O157:H7 em cultura de fezes.** O Sorbitol MacConkey Agar (Biolife Ref. 541669S) é o método de escolha para o isolamento de *E. coli* O157:H7 (atmosfera aeróbica, 24 horas/37°C). Após 24 horas de incubação no meio seletivo, as colónias típicas de *E. coli* O157:H7 serão incolores.

1. Examinar as placas após 1 dia de incubação. Selecionar as colónias típicas de *E. coli* O157:H7. Dispensar 0,7 mL (ou 14 gotas) de tampão de extração num tubo de colheita. Utilizar uma ansa para recolher 3 ou 4 colónias suspeitas de *E. coli* O157:H7 e adicioná-las ao tubo de colheita.
2. Fechar o tubo com o tampão de extração e as colónias suspeitas. Agitar o tubo a fim de assegurar uma boa dispersão da amostra.

##### Procedimento do teste

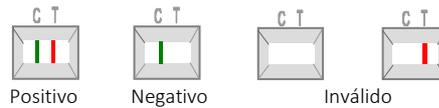
**Deixar que os testes e o tampão atinjam a temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F) antes dos testes. Não abrir os invólucros até estar tudo pronto para realizar o teste.**

1. Retirar a cassete de teste do invólucro de proteção. Identificar a cassete de plástico com os dados do doente.
2. Utilizar uma cassete em separado para cada amostra. Pipetar algum líquido da parte superior do tubo.
3. Dispensar 4 gotas no poço da amostra. Iniciar o cronómetro.
4. Ler o resultado 10 minutos após a distribuição da amostra. Não exceder os 10 minutos.



**10 - LEITURA E INTERPRETAÇÃO**

Interpretar os resultados da seguinte forma:



	E. coli O157:H7	Interpretação de resultados
1.	- VERDE	Não está presente <i>E. coli O157:H7</i> . No existe infecção causada por <i>E. coli O157:H7</i> . Resultado negativo.
	+ VERMELHO-VERDE	Está presente <i>E. coli O157:H7</i> . Existe uma infecção por <i>E. coli O157:H7</i> , presente com um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo portador assintomático, diarreia não hemorrágica, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico (HUS) e a púrpura trombocitopénica (TTP).
3.	OUTRO RESULTADO	Resultado Inválido, é recomendado repetir o teste utilizando a mesma amostra com outra cassette.

INVÁLIDO: ausência total de qualquer linha colorida de controlo (VERDE) independentemente da aparência ou não das linhas de teste (VERMELHO). As principais razões para a falha das linhas de controlo são na sua maioria, volume insuficiente de amostra, procedimento incorreto ou deterioração dos reagentes. Rever o procedimento e repetir o ensaio com um novo teste. Se os sintomas ou situação ainda persistirem, interromper a utilização do kit de teste e contactar o seu distribuidor local.

**NOTAS DE INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

A intensidade da banda de cor vermelha na linha de teste (T) na janela de resultados varia dependendo da concentração de antígenos presentes na amostra. No entanto, nem o valor quantitativo nem a taxa de aumento dos antígenos podem ser determinados por este teste qualitativo.

**11 - CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO**

O procedimento de Controlo de Qualidade Interno está incluído no teste. A linha que aparece na região de controlo (C) é um controlo interno. Confirma que foi adicionado volume suficiente de amostra e seguido o procedimento corretamente.

**12 - VALORES ESPERADOS**

*Escherichia coli O157:H7* causa anualmente 73.000 doenças nos Estados Unidos. Isso significa 8.598 casos, 17% requerem hospitalizações, 4% casos de síndrome hemolítico urémico e 0,5% de mortes. As principais vias de transmissão são: 52% de origem alimentar, 21% desconhecidas, 14% de pessoa para pessoa, 31% de origem hídrica, 3% de contacto com animais e 0,3% relacionadas com laboratório.

**13 - CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO****Sensibilidade analítica (limite de detecção)**

Valor de Limite de Detecção do E.COLI O157 CARD é  $1,87 \times 10^4$  CFU/mL.

**Sensibilidade e especificidade clínicas**

E.COLI O157 CARD foi avaliado para determinar a sensibilidade em amostras e culturas de enriquecimento seletivo, especificidade com organismos produtores de toxinas Shiga, produtores de toxinas não-Shiga e outras espécies de Enterobacteriaceae (Laboratório de Referência para *Escherichia coli* - LREC).

14 estirpes STEC (antigénio O157:H7); 4 estirpes não STEC (O157); 9 estirpes STEC (não O157); 4 outras Enterobacteriaceae spp.

Os resultados mostram: >99% de sensibilidade, 85% de especificidade, PPV 70% e VNP >99%.

**Reação cruzada e Interferências**

Foi realizada uma avaliação para determinar as reações cruzadas de E.COLI O157 CARD. Não há reações cruzadas contra os agentes patogénicos gastrointestinais ocasionalmente presentes nas fezes: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter freundii*; *C. difficile*; *E. coli O22:H8*, *O91:H-*, *O103:H2*, *O111:H21*, *O145:H-*, *O171:H2*, *O174:H8*; *Klebsiella pneumoniae*; *H. pylori*; *Listeria monocytogenes*; *Morganella morganii*; *Proteus mirabilis*; *Salmonella enteritidis*, *paratyphi typhi*, *typhimurium*; *Shigella boydii*, *dysenteriae*, *flexneri*, *sonnei*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*.

**14 - LIMITAÇÕES DO MÉTODO**

- Um excesso de amostra pode causar resultados errados (aparecem bandas castanhas). Diluir a amostra com o líquido de extração e repetir o teste.
- E.COLI O157 CARD só deve ser utilizado em amostras de fezes humanas. A utilização de outras amostras ainda não foi testada. A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; devendo ser obtidas amostras de fezes adequadas.
- Um resultado positivo determina a presença de *E. coli O157:H7* na amostra (determinação qualitativa); no entanto, um resultado positivo deve ser acompanhado de técnicas laboratoriais adicionais (método bioquímico ou por PCR) para confirmar os resultados. A confirmação da infecção só deve ser feita pelo médico após avaliação de todos os resultados clínicos e laboratoriais e deve ser baseada na correlação dos resultados com observações clínicas adicionais.
- Um resultado negativo pode não ter significado porque é possível que a concentração de antígenos na amostra de fezes seja inferior ao valor limite de detecção. Se os sintomas ou situação ainda persistirem, uma determinação de *E. coli O157:H7* deve ser realizada numa amostra de uma cultura de enriquecimento.

**15 - REFERÊNCIAS**

- THOMPSON, J., HODGE, D. and BORCZYK, A.; "Rapid Biochemical Test to Identify Verocytotoxin-Positive Strains of *Escherichia coli* Serotype O157"; *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. 1990, Vol. 28, No. 10, pp 2165-2168.
- VALLANCE B.A. and FINLAY B.B., "Explication of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*", *PNAS*, August 2000, Vol. 97, No. 16, pp. 8799-8806.
- BLANCO, M. et al. "Escherichia coli Verotoxigénicos (ECVT) en Espana: ECVT O157:H7 y NO-O157 en humanos y alimentos. El Ganado bovino y ovino como reservorio. Técnicas para detección de ECVT" Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC).

**TABELA DE SÍMBOLOS APLICÁVEIS**

	Dispositivo para Diagnóstico <i>in vitro</i>		Limites de temperatura		Código do lote (DXXX)		Fabricante		Conservar seco		Identificador único do dispositivo
	Consultar as Instruções de utilização		Data do prazo de validade		Número de Catálogo		Não reutilizar		Frágil, manipular Com cuidado		Manter afastado da luz solar

**HISTÓRICO DE REVISÃO**

Versão	Descrição das alterações	Data
Instruções de Utilização (IFU) - Revisão 5	Esquema e conteúdo atualizados	2023/03

Nota: pequenas alterações tipográficas, gramaticais, e de formatação não estão incluídas no histórico de revisões.

