

Instrukcja użycia

SALMONELLA **ZESTAW SERO-** **QUICK ID**



ZESTAW SERO-QUICK ID ANTYSUROWIC *SALMONELLA*

Do użytku w diagnostyce *in vitro*

Zamierzone użycie

Zestaw Sero-Quick ID *Salmonella* firmy SSI Diagnostica jest przeznaczony dla pełnego serotypowania *S. Enteritidis* (1,9,12:g,m:-) i *S. Typhimurium* (1,4,[5],12:i:1,2). Zestaw Ser-Quick ID jest używany w pomocy diagnostycznej *in vitro* do jakościowego i manualnego, pełnego lub częściowego, serotypowania bakterii metodą aglutynacji szkiełkowej fazy H. Ważne jest, aby do oznaczania antygenów bakteryjnych używać izolatów czystych hodowli.

Opis

Zestaw Sero-Quick ID *Salmonella* firmy SSI Diagnostica składa się z ośmiu fiolek (patrz tabela 1). Zawartość zestawu wystarcza na przynajmniej 30 testów pełnego serotypowania. Antysurowice *Salmonella* O i H są przeznaczone do badań przesiewowych żywych hodowli z nieselektywnej płytki agarowej. Antysurowice *Salmonella* inwersji faz służą do inwersji faz H.

	Antysurowice	Objętość	Liczba testów
Antysurowice O	O:4	3 ml	150
	O:9	3 ml	150
Antysurowice H	H:i	3 ml	150
	H:m	3 ml	150
	H:2	3 ml	150
	H:q,s,t,p,u	3 ml	150
Mieszanka SG dla inwersji fazy	SG2	3 ml	30
	SG6	3 ml	30

Tabela 1: Zawartość zestawu Sero-Quick ID *Salmonella*.

Wszystkie dołączone antysurowice *Salmonella* są absorbowane bez reakcji krzyżowych.

Antysurowice są poliklonalne, przygotowane w królikach z użyciem szczepów referencyjnych zgodnie z metodami zalecanymi przez Instytut Pasteura¹ i absorbowane w celu wyeliminowania przeciwciał reagujących krzyżowo.

Antysurowice firmy SSI Diagnostica są przeznaczone wyłącznie do użytku przez pracowników laboratoriów i/lub pracowników służby zdrowia.

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 i H metodą aglutynacji szkiełkowej. Niektóre hodowle są jednofazowe i mogą być bezpośrednio oznaczane metodą H, podczas gdy druga faza w hodowli dwufazowej jest oznaczana po inwersji faz (metoda Svenda Garda⁴). Po wykonaniu pełnego oznaczenia serotypu hodowli *Salmonella*, nomenklaturę serotypu można określić przy użyciu schematu Kauffmanna-White'a³. Zawartość zestawu jest ograniczona do pełnego serotypowania *S. Enteritidis* (1,9,12:g,m:-) i *S. Typhimurium* (1,4,[5],12:i:1,2).

Środki ostrożności

- Przed użyciem antysurowicy *Salmonella* firmy SSI Diagnostica, należy potwierdzić, że szczep należy do rodzaju *Salmonella*, 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 filtracją (0,22 μ M).

- 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.
- Przed przystąpieniem do badania należy pozostawić składniki zestawu do wyrównania temperatury pokojowej.
- Nie należy mieszać składników danej serii z elementami z innych serii.
- Nie należy stosować antysurowic po upływie ich terminu ważności.
- Sprawdzić fiolki przed użyciem, aby upewnić się, że są nienaruszone. Wszelkie uszkodzone fiolki należy wyrzucić.

Materiały dostarczone

Zestaw Sero-Quick ID *Salmonella* firmy SSI Diagnostica składa się z jednej fioli każdej z następujących surowic: O:4 - O:9 - H:i - H:m - H:2 - H:q,s,t,p,u - SG2 i SG6 (patrz tabela 1).

Antysurowice są dostarczane w butelkach z kroplomierzem zawierających 3 ml gotowych do użycia antysurowic.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

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

Dodatkowe materiały dla inwersji faz

- Sterylne szalki Petriego (średnica wynosząca 6 cm)
- Łaźnia wodna (>90°C)
- Agar swarm
- Pipeta

Przechowywanie i stabilność

Data ważności jest wydrukowana na etykietach.

Antysurowice *Salmonella* muszą 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.

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

Środek konserwujący

Surowice *Salmonella* 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 fiolki, aby upewnić się, że nie ma uszkodzeń i/lub wycieków. W przypadku uszkodzenia lub wycieku wyrzucić fiolkę.

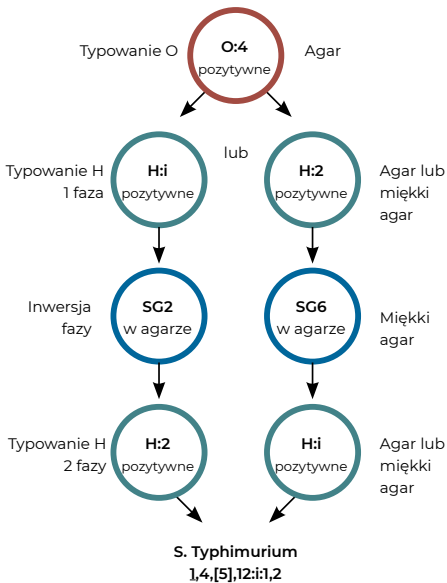
Jako kontrolę negatywną stosuje się sól fizjologiczną w celu potwierdzenia, że szczep nie ulega samoaglutynacji.

Procedura

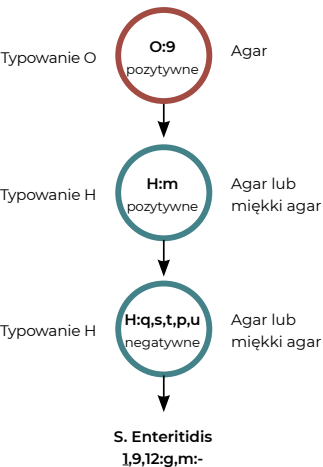
Rozpocząć od badania szczepu/hodowli za pomocą antysurowicy O:4 i O:9.

W przypadku szczepów O:4 pozytywnych postępować z antysurowicami zgodnie z diagramem sekwencji działań (patrz rysunek 1). Zbadać szczep za pomocą antysurowic H:i i H:2, aby znaleźć pierwszą fazę H. Jeśli reakcja dla H:i jest pozytywna, to jest to pierwsza faza. Drugą fazę stwierdza się przez inwersję fazy H z dodatkiem surowicy SG2 w miękkim agarze w celu zahamowania ekspresji antygeny H:i. Następnie wykonać test z surowicą H:2. Jeśli reakcja jest pozytywna to szczep jest S. Typhimurium. Jeśli pierwszą fazą jest H:2, dodać SG6 do miękkiego agaru w celu zahamowania ekspresji antygeny H:2.

W przypadku szczepów O:9 pozytywnych postępować z antysurowicami zgodnie z diagramem sekwencji działań (patrz rysunek 1). Należy upewnić się, że szczep roi się przed przystąpieniem do serotypowania H. Zbadać szczep za pomocą antysurowic H:m i H:q,s,t,p,u. Reakcja H:m musi być pozytywna, a reakcja H:q,s,t,p,u ujemna, aby szczep był S. Enteritidis.



Rysunek 1: Typowanie *S. Typhimurium* oraz *S. Enteritidis*



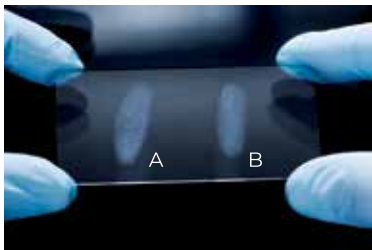
Aglutynacja szkiełkowa z antysurowicami O i H

1. Szczep *Salmonella* jest hodowany przez noc w temperaturze 35–37°C na nioselektywnym podłożu agarowym. Agar swarm jest najlepszym podłożem do hodowli kultur do typowania H. Antygenów H nie można serotypować na nioselektywnym agarze.
2. Nanieść małą kroplę surowicy (ok. 20 µl) na szkiełko szklane.
3. Przenieść hodowlę z 3 do 5 kolonii do kropli surowicy i dobrze wymieszać. Ilość hodowli powinna być wystarczająca do uzyskania wyraźnego mlecznego zmętnienia. Użyć ezy do zaszczepiania lub wykałaczki.
4. Przechylać szkiełko przez 5–10 sekund.
5. Reakcję odczytuje się gołym okiem, trzymając szkiełko przed źródłem światła na czarnym tle (oświetlenie pośrednie).
6. Reakcja dodatnia jest widoczna jako aglutynacja (patrz rysunek 2 reakcja A). Reakcja negatywna polega na utrzymaniu się jednorodnego mlecznego zmętnienia (patrz rysunek

2 reakcja B). Opóźnioną lub słabą aglutynację (po 10 sekundach) należy uznać za negatywną.

Brak reakcji może być spowodowany szczepem wyrażającym antygen Vi, szczepem nieobjętym przez stosowane antysurowice lub szczepem nie będącym *Salmonella*.

Obecność antygenu Vi może zakłócać lub uniemożliwiać aglutynację w antysurowicach O. Izolaty ujemne muszą być zatem badane na obecność antygenu Vi. Ze względu na zmienność formy antygenu Vi, ważne jest, aby wybrać pojedyncze kolonie, ponieważ formy kolonii wyrażające antygen Vi są bardziej nieprzezroczyste niż kolonie Vi ujemne.

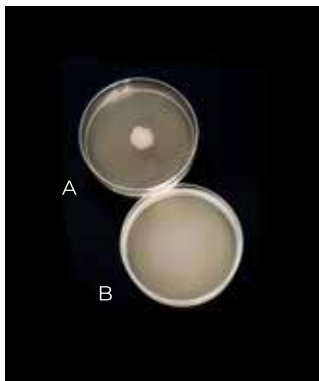


Rysunek 2. Próbką A jest reakcją pozytywną, a próbką B reakcją negatywną.

Inwersja fazy H na płytkę agarową swarm (metoda S. Garda)⁴

1. Rozpuścić agar swarm np. w łaźni wodnej (>90°C), a następnie schłodzić do 45°C.
2. Nanieść 100 µl surowicy H do inwersji faz (odpowiadającej fazie, która została już zidentyfikowana) na środek małej, sterylnej szalki Petriego (średnica wynosząca 6 cm).
3. Wlać 10 ml agaru swarm na surowicę, uzyskując ostateczne rozcieńczenie 1:100.
4. Pozostawić płytkę do zestalenia się w miejscu wylania w temperaturze pokojowej na 10–15 min.
5. Zaszczepić płytkę w centrum eżą pełną świeżej hodowli bakteryjnej z płytki agarowej lub hodowli bulionowej.

6. Inkubować przez noc w temperaturze 35–37°C.
7. Do aglutynacji szkiełkowej użyć materiału hodowlanego z krawędzi strefy wzrostu. Upewnić się, że szczep roi się aż do krawędzi szalki Petriego przed badaniem metodą aglutynacji szkiełkowej (patrz rysunek 3).
8. Jeśli 100 µl antysurowic z inwersją faz nie hamuje całkowicie danej fazy, należy powtórzyć procedurę z kroku 2 używając 200 µL antysurowic z inwersją faz. Jeśli druga faza nie jest wyrażona, nie wyklucza to posiadania przez szczep drugiej fazy.



Rysunek 3. Ilustracja inwersji fazowej jedno- i dwufazowej hodowli *Salmonella*. Hodowla monofazowa nie rośnie (A), a hodowla dwufazowa rośnie do krawędzi szalki Petriego (B).

Interpretacja wyników

Aglutynacja szkiełkowa:

Reakcja dodatnia jest widoczna jako aglutynacja, podczas gdy reakcja negatywna jest widoczna jako jednorodne mleczne zmętnienie (patrz rysunek 2).

Nie należy interpretować wyników po 10 sekundach, ponieważ żadna reakcja widoczna po 10 sekundach nie może być uznana za prawdziwy wynik pozytywny.

Jeśli w którymś z etapów pojawi się wynik negatywny, dany szczep nie jest *S. Typhimurium* ani *S. Enteritidis*. W tym przypadku wykonać pełne serotypowanie według Kaufmanna White'a.

Inwersja fazy:

W hodowli *Salmonella* zazwyczaj występuje tylko jedna faza dominująca, która nazywana jest fazą 1 i fazę tę można oznaczyć na agarze swarm bez dodawania surowicy inwersji fazy. Faza 2 jest oznaczana przez dodanie do agaru swarm odpowiedniej surowicy inwersyjnej dla fazy 1. Pozwala to bakteriom na rojenie się poprzez ekspresję antygenów drugiej fazy H. Faza może być serotypowana przy użyciu surowicy H do aglutynacji szkiełkowej.

Utylizacja

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

Ograniczenia

- Hodowla musi być potwierdzona jako *Salmonella* przed określeniem serotypu przy użyciu antysurowic firmy SSI Diagnostica.
- Antysurowice z inwersją fazy nie mogą być stosowane do aglutynacji szkiełkowej, a antysurowice do aglutynacji szkiełkowej nie mogą być stosowane do inwersji fazy, mimo że są skierowane przeciwko temu samemu antygenowi.
- Brak reakcji może być spowodowany szczepem wyrażającym antygen Vi, szczepem nieobjętym przez stosowane antysurowice lub szczepem nie będącym *Salmonella*.
- S. Hilligdon (9,46:g,m:-) nie można odróżnić od S. Enteritidis przy użyciu tego zestawu, ponieważ obydwa serotypy będą dodatnie w O:9 i H:m oraz ujemne w H:q,s,t,p,u. Częstość występowania S. Hilligdon jest jednak bardzo niska.

Wydajność

Czułość, swoistość i powtarzalność

Ogólne wyniki antysurowic <i>Salmonella</i>		
	Odsetek (liczba pozytywnych/ rzeczywście pozytywnych)	95% przedział ufności
Czułość	96% (271/282)	93–98
Swoistość	99% (287/290)	97–100
Powtarzalność	98% (880/898)	97–99

Tabela 2. Czułość, swoistość i powtarzalność dla antysurowicy *Salmonella* w zestawie Sero-Quick ID *Salmonella*

Odtwarzalność

Odtwarzalność w obrębie różnych grup antysurowic i wszystkich antysurowic łącznie wynosi 100% (99%–100%). Dlatego wszystkie produkowane antysurowice 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 13485².



18350



Piśmiennictwo

1. Grimont, P.A.D. and Weill, F.-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 9th ed., 2007.

2. ISO/TR 6579-3:2014 Guideline "Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*"

3. Michel Y. Popoff and L. Le Minor. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8. Ed. (2001 with supplements). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.

4. Gard, S. Das Schwärmphänomen in der *Salmonella*-Gruppe und seine praktische Ausnützung. Zeit. f. Hyg. Inf. Krankh. 1938, 120;615-619.

Informacje i zamawianie

SSI Diagnostica A/S

Herredsvejen 2

3400 Hillerød

Dania

Tel. +45 4829 9100

info@ssidiagnostica.com

ssidiagnostica.com

shop.ssidiagnostica.com

SSI Diagnostica A/S
Herredsvejen 2
3400 Hillerød
Denmark

ssidiagnostica.com

Improving
Microbiology