



Instrukcja używania

Zestaw surowic SIT EnTy Szybki Identyfikacyjny Test do diagnostyki *in vitro* szczepów *Salmonella* Enteritidis i Typhimurium

Zastosowanie

Zestaw surowic SIT EnTy jest wyrobem medycznym do diagnostyki *in vitro* służącym do szybkiej identyfikacji szczepów *Salmonella* Enteritidis i Typhimurium wyizolowanych z próbek pobranych od ludzi, zwierząt lub z innego materiału badawczego.

Zestaw zawiera poliklonalne, absorbowane surowice do aglutynacji szkiełkowej bakterii *Salmonella*. Surowice w przygotowanym zestawie pozwalają na pełną identyfikację serologiczną szczepów *Salmonella* Enteritidis oraz *Salmonella* Typhimurium. Antygeny powierzchniowe bakterii tworzą widzialne gołym okiem kompleksy ze swoistymi przeciwciałami zawartymi w surowicy (reakcja aglutynacji). Surowice w zestawie znajdują się w szklanych butelkach z zakraplaczem. Są przygotowane w postaci gotowej do użycia. Produkt przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnego zastosowania laboratoryjnego przez przeszkolony personel z zachowaniem podstawowych zasad antyseptyki i aseptyki.

Skład

Surowice do aglutynacji szkiełkowej pałeczek *Salmonella* są wykonane z przeciwciał pozyskanych od zwierząt immunizowanych inaktywowanymi szczepami bakterii, absorbowane w celu uzyskania wybranych przeciwciał i rozcieńczone 0,85% NaCl. Są one kontrolowane z zestawem ponad 180 szczepów. Surowice są konserwowane 0,01% tiomersalem.

Zestaw SIT EnTy zawiera 15 buteleczek surowic wraz z zakraplaczem:

- poliwalentną surowicę HM - 5 ml (~125 oznaczeń),
- surowice do identyfikacji antygenów somatycznych: O:4; O:9; O:46, po 3 ml (~75 oznaczeń),
- surowice do identyfikacji antygenów rzęskowych: H:g,m; H:m; H;q; H:s; H:t; H:i; H:2; H:5, H:6 po 3 ml (~75 oznaczeń),
- oraz surowice do hamowania dominującej fazy rzęskowej: H:i i H:2 po 1 ml (~5 reakcji).

Sposób użycia

Przygotowanie próbek

Próbki należy pobrać do sterylnych pojemników, przetransportować do laboratorium oraz przetwarzać zgodnie z wytycznymi dla danego rodzaju próbek. Należy wybierać wyraźnie odgraniczone, typowe kolonie. Do testów należy używać niezanieczyszczonych hodowli bakteryjnych.

Przygotowanie badanych szczepów:

Po przeprowadzeniu testów biochemicznych, których wyniki sugerują, że badane szczepy należą do rodzaju *Salmonella* należy badane szczepy hodować w temperaturze od +34 do +38°C przez 24±3 godziny na podłożu stałym (dla określenia antygenów somatycznych – 1,5% agar odżywczy, dla antygenów rzęskowych – podłoże miękkie 0,5% wg Garda. (Rekomendujemy agar 1,5% - Immunolab, nr katalogowy PG002, PGS02 oraz podłoże agarowe miękkie wg Garda 0,5%- Immunolab, nr katalogowy PG001, PGS01). Tak przygotowane testy należy poddać identyfikacji serologicznej w teście aglutynacji szkiełkowej.

Zasady przeprowadzenia testu aglutynacji szkiełkowej:

W celu zachowania jałowości produktu (której brak może uniemożliwić wykonanie oznaczenia lub właściwą interpretację wyników), wykonanie testu powinno odbywać się w warunkach uniemożliwiających kontaminację lub skażenie produktu.

Przed użyciem doprowadzić surowice do temperatury pokojowej (od +18 do +25°C). W przypadku zmętnienia surowice odwirować.

- I. Na odtłuszczonym szkiełku podstawowym umieścić kroplę 3% NaCl lub surowicy.
- II. Jałową eż/bagietką pobrać szczep z podłoża i umieścić obok kropli. Rozcierać szczep na szkiełku łącząc z surowicą tak, aby powstała jednolita zawiesina o mlecznym kolorze.
- III. Kołysząc lekko szkiełkiem ruchem kolistym przez **10 – 30 sekund (najdłużej do 1 minuty!)** obserwować wynik reakcji. *Uważać, aby kropla nie ściekła ze szkiełka.*

Odczyt i interpretacja wyników

Wystąpienie aglutynacji jest dodatnim wynikiem reakcji. Brak aglutynacji jest ujemnym wynikiem reakcji.

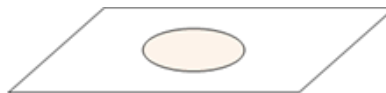
Odczytu aglutynacji należy dokonać wg następującej skali:

- +++ obecne aglutynaty rozmieszczone w całej przezroczystej kropli lub na jej obwodzie,
- ++ obecne aglutynaty rozmieszczone w półprzezroczystej kropli,
- + obecne drobne aglutynaty na obrzeżu lub na dnie kropli, kropla mlecznobiała. Wynik taki nie pozwala na ustalenie rozpoznania. Najczęściej występuje w szczepach dwufazowych z silnie rozwiniętą jedną z faz. W celu ustalenia składu antygenów rzęskowych należy zahamować fazę silnie rozwiniętą.
- (-) brak aglutynatów, kropla mlecznobiała.



Aglutynacja „+++”

- ⊕ aglutynaty
- ⊕ zwiększanie się przezroczystości kropli



Brak aglutynacji „-”

- ⊖ brak strątot
- ⊖ „mleczna” kropla

Aglutynacja jest lepiej widoczna, jeżeli wynik reakcji obserwuje się nad ciemnym tłem z użyciem lupy o 5-cio krotnym powiększeniu.

Nie dopuszczać do wyschnięcia kropli, gdyż daje to wynik fałszywie pozytywny.

Na naszej stronie <http://immunolab.com.pl/film> zamieszczono film instruktażowy zawierający instrukcję wykonania badania i interpretacji wyników.

Przygotowanie badanych szczepów:

1. Wykonać testy aglutynacji szkiełkowej zgodnie ze Schematem kolejności wykonywania testu aglutynacji szkiełkowej dla SIT EnTy.
 - 1.1. Wykonywanie identyfikacji należy zacząć od sprawdzenia szczepu z 3% roztworem NaCl. *Jeżeli aglutynacja wystąpiła, oznacza to, że szczep jest szorstki i wykazuje auto-aglutynację. Takiego szczepu nie można identyfikować serologicznie w teście aglutynacji szkiełkowej.*
 - 1.2. Wykonać aglutynację z poliwalentną surowicą HM. *Pozytywny wynik potwierdza, że badany szczep należy do rodzaju *Salmonella*.*
 - 1.3. Wykonać badanie z surowicami O:9 i O:4.

Pozytywna reakcja z jedną z surowic pozwala na wstępne określenie grupy serologicznej. *Brak reakcji wskazuje na konieczność prowadzenia badań z dalszymi surowicami dla antygenów grupowych. Oznacza to, że w badanym materiale nie ma bakterii S. Enteritidis i S. Typhimurium, ale mogą być inne szczepy Salmonella.*

- Do przeprowadzenia pełnej identyfikacji antygenów rzęskowych należy posiać bakterie na podłoże z agarom miękkim 0,5% wg Garda i inkubować w temperaturze 34-38°C przez 24±3 godziny.

Należy pamiętać o tym, że samo potwierdzenie obecności pożądanego antygenów nie wystarczy. Trzeba wykluczyć możliwe występowanie innych antygenów, które odróżniają szczep *Salmonella* od *Salmonella* Enteritidis i Typhimurium.

Poniżej przedstawione są właściwe wyniki reakcji potwierdzające obecność *Salmonella* Enteritidis oraz Typhimurium (Tabela 1):

Tabela 1. Wyniki reakcji aglutynacji szkiełkowej dla *Salmonella* Enteritidis oraz *Salmonella* Typhimurium.

Salmonella Enteritidis [1,9,12:g,m:-]										
					Faza I					Faza II
Sól/surowica	3% NaCl	HM	O:9	O:46	H:g,m	H:m	H:q	H:s	H:t	-
Wynik	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
Salmonella Typhimurium * [1,4,12:i:1,2]										
				Faza I			Faza II			
Sól/surowica	3% NaCl	HM	O:4	H: i			H:2	H:5	H:6	
Wynik	-	+++	+++	+++			+++	-	-	

+++ reakcja dodatnia, aglutynacja widoczna gołym okiem

- reakcja ujemna, brak aglutynacji, mleczna zawiesina

*Należy pamiętać, że występują również jednofazowe szczepy *Salmonella* Typhimurium o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:-

Dodatkowe informacje potrzebne do identyfikacji *Salmonella* Typhimurium

Jeżeli aglutynacja z surowicą H:i jest dodatnia, a z surowicą H:2 jest ujemna, oznacza to silną pierwszą fazę szczepu, którą trzeba zahamować. Drugą fazę ujawnia się przez hamowanie fazy dominującej poprzez dodanie do miękkiego podłoża agarowego 0,5% wg Garda surowicy z przeciwciałami przeciw antygenom silnej fazy, w tym wypadku surowicy H:i. Jeżeli po zahamowaniu fazy wciąż nie uzyskuje się potwierdzenia fazy H:2 należy przyjąć, że ma się do czynienia z jednofazowym szczepem *S. Typhimurium*.

Hamowanie fazy dominującej

Hamowanie przeprowadza się na płytkach z miękkim podłożem agarowym 0,5% wg metody S. Garda, w sytuacji, gdy silne występowanie jednej z faz uniemożliwia wykrycie drugiej fazy szczepu.

Wykonanie hamowania fazy:

W przypadku, gdy badany szczep wykazuje reakcję pozytywną tylko z surowicą przeciwko antygenom jednej z faz (faza dominująca), a druga faza jest niewykrywalna (faza utajona), należy przeprowadzić hamowanie fazy dominującej, w celu indukcji fazy utajonej.

W tym celu należy:

- Schłodzić przygotowane, płynne podłoże agarowe miękkie 0,5% wg Garda do temperatury ~ +45°C.
- Nakropić na środek dna małej, sterylnej płytki Petriego (Ø ok.5 cm) 100-200µl surowicy do hamowania. Należy zachować ostrożność, aby nie dotykać podłoża końcówką zakraplacza.
- Do nakropionej surowicy dodać ok. 10 ml podłoża agarowego miękkiego 0,5% wg Garda i wymieszać delikatnie kołyszając płytką.
- Pozostawić płytkę w temperaturze pokojowej, aż do stężenia agaru. (Nie suszyć!)
- Za pomocą jałowej ezy pobrać hodowlę szczepu do hamowania (z płytki agarowej 0,5%) i zaszczyć na podłożu agarowym w centralnej części płytki.
- Inkubować przez noc w temperaturze od +34 do +38°C.
Nie odwracać płytki wieczkiem do dołu!
- Materiał z peryferyjnych części płytki jest odpowiedni do wykonania aglutynacji szkiełkowej.

Wykonanie hamowania fazy- metoda alternatywna

- Przygotować małą płytkę Petriego (Ø ok.5 cm) z ok. 10ml sterylnego, zestalonego podłoża agarowego miękkiego 0,5% wg Garda. Płytkę przechowywać w pozycji wieczkiem do góry. Nie suszyć!
- Nakropić na środek płytki z agarom 100-200µl surowicy do hamowania. Należy zachować ostrożność, aby nie dotykać płytki końcówką zakraplacza.
- Wetrzeć surowicę w powierzchnię agaru za pomocą jałowej głaszczki.
- Za pomocą ezy pobrać hodowlę szczepu do hamowania (z płytki agarowej 0,5%) i zaszczyć na podłożu agarowym w centralnej części płytki.
- Inkubować przez noc w temperaturze od +34 do +38°C. Nie odwracać płytki wieczkiem do dołu!
- Materiał z peryferyjnych części płytki jest odpowiedni do wykonania aglutynacji szkiełkowej.
 - Jeżeli dominująca faza H nie została zahamowana, należy powtórzyć procedurę.
 - Materiał do zaszczenia należy pobrać z płytki, na której przeprowadzano wcześniejsze hamowanie.

Kontrola jakości przez użytkownika

W trakcie stosowania surowicy zaleca się testowanie kontrolne z użyciem wzorcowych szczepów *Salmonella* (zarówno kontroli dodatnich, jak i ujemnych), w celu zweryfikowania poprawności wykonania metody i działania surowic, postępując analogicznie jak w przypadku szczepów badanych.

Ograniczenia metody

W wyjątkowych przypadkach istnieje możliwość reakcji krzyżowych z innymi gatunkami bakterii z rodziny Enterobacteriaceae (np. szczepy *Citrobacter* spp., *Hafnia alvei*, *Proteus* spp., *E. coli* lub *Shigella* spp.) ze względu na wysokie podobieństwo między antygenami lub ich pokrewieństwo. Z tego powodu niezbędne jest badanie biochemiczne w celu ustalenia przynależności badanego szczepu do rodzaju *Salmonella*. Produkt nie służy do identyfikacji innych bakterii niż z rodzaju *Salmonella*.

Materiały potrzebne do pracy, które nie wchodzi w skład zestawu:

ciemne tło, eza do posiewów bakteriologicznych, lupa, szkiełka podstawowe, 3% roztwór NaCl, pojemnik na skażone materiały, szalka Petriego, głaszczka, film instruktażowy (dostępny na stronie <http://immunolab.com.pl/film>).

Warunki przechowywania

- Surowice należy przechowywać w temperaturze **od +2°C do +8°C**.
- Transport do 3 dni w temperaturach dodatnich nieprzekraczających +25°C nie zmienia właściwości produktu.
- **NIE ZAMRAŻAĆ!**
- Chronić od światła.
- Nie stosować po upływie terminu ważności zamieszczonego na opakowaniu.
- Surowica jest produktem wielokrotnego użytku.
- Data ważności dotyczy produktu w nienaruszonym opakowaniu, przechowywanego zgodnie z instrukcją oraz produktu po otwarciu, używanego zgodnie z przewidzianym zastosowaniem, w warunkach opisanych w instrukcji oraz przechowywanym po otwarciu zgodnie z instrukcją.
- Nie stosować surowicy o zmienionych cechach fizykochemicznych wskazujących na zanieczyszczenie mikrobiologiczne.
- Nie sterylizować surowicy do użycia.
- W surowicy może pojawić się zmętnienie i/lub osad nie spowodowany zanieczyszczeniem mikrobiologicznym. Surowica nadal nadaje się do użytku, ale konieczne jest jej odwirowanie (8000rpm., przez 15 min.), w celu uzyskania prawidłowych wyników aglutynacji.

Środki ostrożności

- Produkt nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka i środowiska, jeżeli jest użytkowany zgodnie z instrukcją.
- Należy przestrzegać aseptycznej techniki pracy i stosować środki ostrożności w kwestii zagrożenia mikrobiologicznego podczas wykonywania wszystkich procedur.
- Należy ściśle przestrzegać instrukcji użycia.
- Każdy poważny incydent związany z wyrobem należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi państwowemu, w którym użytkownik ma miejsce zamieszkania lub siedzibę.

Środki ostrożności przy pracy z materiałem zakaźnym:

- Surowice królicze zawierają materiał pochodzenia zwierzęcego i należy je traktować jako materiał potencjalnie zakaźny, odpowiednio się z nimi obchodząc.
- Wykonanie testu aglutynacji szkiełkowej wiąże się z pracą z bakteriami chorobotwórczymi, w związku z tym należy przestrzegać wszystkich niezbędnych zasad obowiązujących przy pracy z zakaźnym materiałem mikrobiologicznym. Stosować odzież ochronną i rękawice ochronne. Pobrany materiał do badań oraz materiał na szkiełku zabezpieczyć przed dostępem osób trzecich z uwagi na możliwość zakażenia osób trzecich. Zużyte szkiełka z surowicą i materiałem zakaźnym, oraz inne materiały skażone należy poddać sterylizacji w autoklawie lub postępować zgodnie z obowiązującymi zasadami w laboratorium.



Producent

Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella „IMMUNOLAB Sp. z o.o.”

Adres: ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, Polska

Tel./Fax: 58 781-44-91,

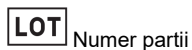
E-mail: info@immunolab.com;

www.immunolab.com.pl

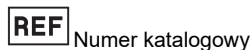
Wyjaśnienie użytych symboli:



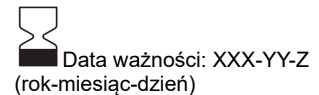
Producent



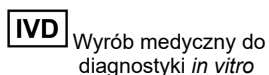
Numer partii



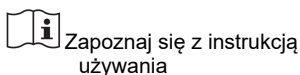
Numer katalogowy



Data ważności: XXX-YY-Z
(rok-miesiąc-dzień)



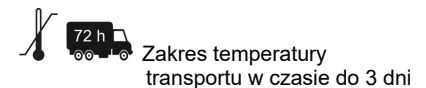
Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*



Zapoznaj się z instrukcją używania



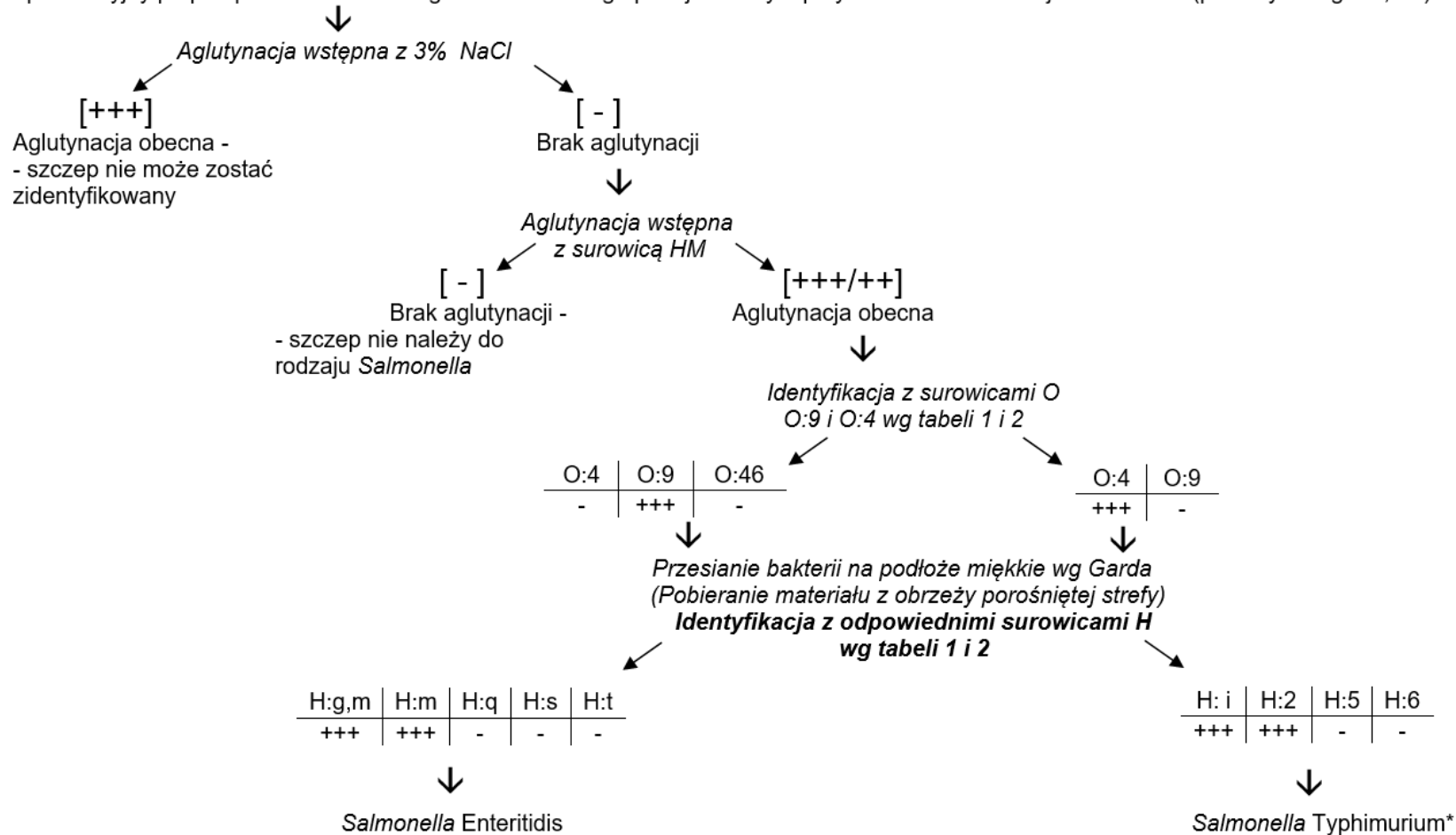
Zakres temperatury przechowywania



Zakres temperatury transportu w czasie do 3 dni

Schemat kolejności wykonywania testu aglutynacji szkiełkowej dla SIT EnTy

Szczep bakteryjny po przeprowadzeniu szeregu biochemicznego podejrzewany o przynależność do rodzaju *Salmonella* (posiany na agar 1,5%)



* Należy pamiętać, że występują również jednofazowe szczepy *Salmonella* Typhimurium o wzorze antygenowym: 1,4,[5],12:i:-

O:4	O:9	H:i	H:2	H:5	H:6
+++	-	+++	-	-	-