sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 700 144-0 | F: +49 30 700 144-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

Anti-Salmonella H

Reagente de teste para a aglutinação em lâmina de microscópio e indução de fase (PI)

INFORMAÇÕES PARA UTILIZAÇÃO POR PROFISSIONAIS

CE IVD

pt

Utilização indicada

Os reagentes de teste Anti-Salmonella H servem como determinação ou análise do antigene H das estirpes de *Salmonella* de acordo com o esquema White-Kauffmann-Le-Minor (esquema de Kauffmann-White) com a ajuda da aglutinação em lâmina de microscópio. Eles permitem ainda a determinação do serovar. Os reagentes de teste assinalados constantes da tabela abaixo podem ser utilizados também para indução da fase H não detetável em estirpes bifásicas (procedimento de inibição de calor segundo Sven Gard).

Princípio do teste

Se a estirpe de *Salmonella* possuir um antigene H correspondente do reagente de teste da área de cobertura, o mesmo fica ligado ao anticorpo específico aquando da mistura.. No seguimento da reação entre antigene e anticorpo, a estirpe fica visivelmente aglutinada.

Composição

Os reagentes de teste são anticorpos monoclonais, soros de teste ou uma mistura de anticorpos monoclonais e soro de teste. Os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de sobrenadantes de cultura de linhas de células híbridas, as quais secretaram anticorpos contra os antigenes H de *Salmonella* correspondentes. Os soros de teste são soros de coelho imunizado libertados através da absorção de aglutininas não específicas.
Agentes de estabilização: Azida sódica (NaN_3) 0,9 mg/ml

Especificidades disponíveis Anti-Salmonella

Especificidade	Antigene comprovado	PI
H:a	H:a	x
H:b	H:b	x
H:c	H:c	x
H:d	H:d	x
H:E	H:e,h; e,n,x; e,n,z15; e,n,x,z15	x
H:f	H:f,g; f,g,s; f,g,t	
H:g	todas as combinações de antigene do complexo H:G exceto H:m,t	x
H:g,m	todas as combinações de antigene do complexo H:G incluindo H:m,t	
H:h	H:e,h	
H:i	H:i	x
H:k	H:k	x
H:L	H:ℓ,v; ℓ,w; ℓ,z13; ℓ,z28; ℓ,z13,z28	x
H:m	H:g,m; g,m,s; g,m,s,t; g,m,q; g,m,p,s; g,m,t; m,p,t,u; m,t	
H:n	H:e,n,x; e,n,z15; e,n,x,z15	x
H:p	H:g,m,p,s; g,p; g,p,s; g,p,u; m,p,t,u	
H:q	H:g,q; g,m,q	
H:r	H:r	x
H:s	H:f,g,s; g,m,s; g,m,s,t; g,p,s; g,s,t	
H:t	H:m,t; f,g,t; g,m,t; g,m,s,t; g,t; g,s,t; m,p,t,u	
H:u	H:g,p,u; m,p,t,u	
H:v	H:l,v	
H:w	H:l,w	
H:x	H:e,n,x; e,n,x,z15	
H:y	H:y	x
H:z [1)]	H:z (I, II, III)	x
H:z4,z23	H:z4,z23; z4,z24; z4,z32; z4,z23,z32	
H:z6	H:z6	
H:z10	H:z10	x
H:z15	H:e,n,z15; e,n,x,z15	
H:z23	H:z4,z23; z4,z23,z32	
H:z24	H:z4,z24	
H:z28	H:ℓ,z28; ℓ,z13,z28	
H:z29	H:z29	
H:z32	H:z4,z32	
H:z35	H:z35	x
H:z38	H:z38	x
H:z41	H:z41	x
H:1	H:1,2; 1,5; 1,6; 1,7; 1,2,7; 1,5,7	x
H:2	H:1,2	
H:5	H:1,5	
H:6	H:1,6	
H:7	H:1,7	

[1)] H:z reconhecido nas subespécies I, II e III

Formato de dosagem, conservação e condições de armazenagem

Os reagentes de teste que são utilizados com frequência nas práticas microbiológicas existem na forma fluida e estão prontos a serem utilizados. Os reagentes de teste para especificidades com utilizações reduzidas são liofilizados.
Os reagentes de teste **fluidos** vêm selados de origem e podem ser utilizados, se armazenados a uma temperatura entre 2...8 °C, até à data indicada na etiqueta. Após utilização, os frascos devem ser novamente bem fechados.
Os reagentes de teste **liofilizados** devem ser dissolvidos antes da utilização, em 1 ml ou 5 ml, de acordo com a indicação, de água destilada e bem isolados com a pipeta incluída. Se armazenados entre 2...8 °C, os reagentes podem ser utilizados pelo menos 18 meses, mas no máximo até à data indicada na etiqueta.
Ocasionalmente, podem ocorrer nos reagentes de teste turvações não provocadas por micróbios. Estas não comprometem a eficácia dos reagentes de teste e podem ser eliminadas por centrifugação ou filtragem.
Antes de serem utilizados, os reagentes de teste devem estar à temperatura ambiente (18...26 °C).

Advertências e medidas de segurança

Devido à proveniência biotecnológica do anticorpo monoclonal, o risco de contaminação por agentes patogénicos está praticamente excluído. Devido ao conteúdo do material de origem animal (soro de vitelo fetal, agente estabilizante), o mesmo deve ser manuseado como sendo potencialmente infeccioso. Os reagentes de teste que contêm material biológico na forma de soro de coelho devem ser considerados como potencialmente infecciosos e manuseados em conformidade. Devido ao teor de azida sódica, o contacto com a pele e as mucosas deve ser evitado e, caso necessário, os mesmos devem ser limpos com bastante água. Uma vez que a aplicação da aglutinação em lâmina de microscópio é trabalhada com agentes patogénicos originais, devem ser respeitadas as medidas de proteção no trabalho (perigo de infeção).

Materiais de trabalho e equipamentos não fornecidos

Lâminas de vidro, agitador, soro fisiológico (9 g/l NaCl), contentor para eliminar materiais infecciosos, esquema de White-Kauffmann-Le Minor, placas de Petri esterilizadas (6 cm de diâmetro), agar aquecido, micro-ondas ou banho-maria, termómetro.

Material de teste e metodologia

1. Determinação do antigene

1.1 De uma subcultura de 16 a 20 horas (por exemplo, agar nutritivo ou Kligler) é esfregado um pouco de volume de bactérias da parte inferior húmida do agar angulado numa gota de reagente de teste (cerca de 25 µl) Anti-Salmonella H para uma suspensão homogénea e ligeiramente leitosa. A lâmina de microscópio deverá estar pousada numa base escura. A lâmina de microscópio é levantada contra uma fonte de luz com fundo preto, rodada e o resultado é lido a olho nu. Para excluir as aglutinações espontâneas, deverá utilizar-se um controlo negativo com soro fisiológico em vez do reagente de teste.
1.2 Se a determinação do antigene H não for conseguida através do método acima descrito, a estirpe deverá ser inoculada sobre agar aquecido para melhor expressão dos antigenes flagelos. Para obter o agar aquecido, recomendamos o meio de cultura já pronto REF sifin TN 1702. São colocados 10 ml desse agar aquecido, após liquefação, numa placa de Petri (6 cm de diâmetro). Após solidificar, a superfície de agar é humedecida com cerca de 100 µl de água destilada esterilizada e a estirpe é aplicada, com a forma de um ponto, no meio da placa. A placa é incubada com a camada de agar virada para baixo até ao dia seguinte a uma temperatura entre 35...37 °C. Para a aglutinação em lâmina de microscópio é retirado o material existente na beira da placa.

2. Indução de fase

Em estirpes bifásicas, em que apenas uma fase H é comprovável, o processo de inibição de calor deve ser submetido a indução da segunda fase de acordo com Sven Gard.
2.1. 0,1 a 0,2 ml de reagente de teste Anti-Salmonella H são misturados com 10 ml liquefeitos de agar aquecido e arrefecido a 40...45 °C, numa placa de Petri de 6 cm de diâmetro. Após a solidificação do agar, a placa é humedecida de acordo com o ponto 1.2., inoculada com a estirpe de Salmonella, incubada, processando-se a seguir a aglutinação em lâmina de microscópio. Se não se conseguir proceder à fase de indução, repetir o procedimento de inibição.
2.2. Além deste procedimento clássico, recomendamos a seguinte abordagem fácil: Numa placa (6 cm de diâmetro) com 10 ml de agar aquecido são vertidos 0,1 a 0,2 ml de reagente de teste de Anti-Salmonella H e espalhados pela superfície com uma espátula de vidro esterilizada. Em seguida, o meio da placa é inoculado e incubado conforme indicado acima. Após entre 16 a 20 horas pode ser feita a identificação, a partir da estirpe aquecida, da segunda fase H não inibida. O procedimento mais fácil permite a comprovação da segunda fase, normalmente, na primeira tentativa.

Avaliação dos resultados

Só é possível uma avaliação se o controlo negativo (NK) permanecer turvo com aspeto leitoso.
Positivo: Aglutinação visível após 1 a 20 oscilações. No caso de uma forte reação positiva, ocorre uma aglutinação (flocos grossos ou finos) assim que o volume de bactérias é friccionado, com resultado positivo fraco apenas após 10 a 20 oscilações.
Negativo: Uma suspensão que permaneça turva e leitosa ou uma reação que ocorra após mais de 20 oscilações é um resultado negativo.

Garantia de qualidade no procedimento de teste

Para o controlo da qualidade da tipagem serológica através da aglutinação em lâmina de microscópio, é importante que as estirpes utilizadas para esse fim consigam exprimir bem os seus antigenes na superfície da célula. Recomenda-se, assim, que, para aplicação do controlo de qualidade, sejam usadas estirpes de proveniência interlaboratorial ou de proveniência definida de estirpes de campo caracterizadas como externas, ou ainda *Salmonella* O, antigene de teste H adequado comercialmente disponível.

Limitações do método

Os reagentes de teste reagem apenas com estirpes de *Salmonella* que contêm o antigene da especificidade declarada. Não se conseguiu demonstrar reações cruzadas com estirpes de outros géneros de Enterobactérias. A determinação do antigene H ocorre após a comprovação serológica do(s) antigene(s) O e da classificação bioquímica do género *Salmonella*.

Explicação dos símbolos utilizados

LOT	Número do lote (Denominação do lote)		Utilizável até AAAA-MM (MM = Fim do mês)
REF	Número do pedido		Limitação de temperatura
IVD	Diagnóstico in vitro		Esteja atento às instruções de utilização
TR	Reagente de teste		Aglutinação em lâmina de microscópio
mTR	Reagente de teste monoclonal	LYO	liofilizado
PI	Indução de fase		

Data da edição: 10/09/2019