

MAST[®] ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER

Uso previsto

Antisueros líquidos y estables para la serotipificación de los antígenos estables al calor de *Campylobacter jejuni* por el procedimiento de hemoaglutinación pasiva.

MAST[®] ASSURE ANTISERUM REAGENTS FOR PREPARATION OF SENSITISED RED BLOOD CELLS

Reagentes para la extracción de antígenos bacterianos y para el emparejamiento de antígenos extraídos de células rojas sanguíneas de polluelo. Para uso en la serotipificación de *Campylobacter jejuni* por el método pasivo de hemoaglutinación.

SOLAMENTE PARA USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

Contenido: Ver etiqueta del envase.

Composición

Los MAST[®] ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER son preparados de conejos hiperinmunizados con cepas estándar de microorganismos muertos que poseen serotipos conocidos o grupos específicos de antígenos y contienen azide de sodio al 0.085% como conservante.

MAST[®] ASSURE ANTISERUM REAGENTES PARA LA PREPARACIÓN DE CELULAS ROJAS SANGUINEAS SENSIBILIZADAS contiene los siguientes componentes:

- Diluyente Muestra de Células Rojas Sanguíneas de Polluelo designadas, listo para usar. 1x 25ml. Contiene aldehído arreglado de eritrocitos de polluelo suspendido en salino.
- Reagente de Extracción 1, listo para usar 1x 13ml. Contiene solución de ácido acético.
- Reagente de Extracción 2, listo para usar 1x 13ml. Contiene una solución de nitrato de sodio.
- Reagente de Extracción 3, listo para usar 1x 13ml. Contiene solución Tampón Tris.
- Solución Tampón, lista para usar. 2x 50ml. Contiene una solución salina de fosfato tampón.

Los componentes 1, 4 y 5 contienen el 0.085% de azide de sodio como conservante.

Almacenamiento y caducidad

Almacenar sin abrir 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del envase. Una vez abierto, MAST[®] ASSURE ANTISERUM debe ser almacenado a 2 a 8°C y puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad dada en la etiqueta.

No volver a congelar los reagentes.

Advertencias y precauciones

Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*. Observar las precauciones de seguridad y utilizar técnicas asépticas. Debe ser utilizado solo por personal de laboratorio cualificado y con experiencia. Antes del desecho, esterilizar todo el material biológico. El conservante de azide de sodio puede ser tóxico si se ingiere y puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre para formar sales altamente explosivas. Desechar siempre tirando de la cisterna para que se vaya por el desagüe con gran cantidad de agua. Referirse a la hoja de seguridad del producto.

Materiales requeridos pero no proporcionados

Accesorios y productos estándar para análisis microbiológico y equipos como por ejemplo: lazos, pabillos aplicadores, tubos de ensayo, pipetas, hisopos, medios de cultivo MAST[®], incineradores e incubadores, etc.... así como componentes específicos como:

- solución salina estéril al 0.85%
- centrifugador capaz de alcanzar 7000 rpm.
- placas multipocillo de V-fondos, cámara húmeda
- los MAST[®] ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER son designados para usar conjuntamente con MAST[®] ASSURE ANTISERUM REAGENTES PARA PREPARACIÓN DE CÉLULAS ROJAS SANGUÍNEAS SENSIBILIZADAS. Estos reagentes puede ser pedidos con el código M42201.
- MAST[®] ASSURE ANTISERUM REAGENTES PARA LA PREPARACIÓN DE CÉLULAS ROJAS SANGUÍNEAS SENSIBILIZADAS son proporcionados para usar con MAST[®] ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER.

Procedimiento

A. Extracción de Antígenos bacterianos.

- Dispensar 0.25ml de solución salina estéril en 1.5ml y centrifugar el tubo.
- Usando un lazo bacteriológico, emulsionar las células bacterianas del cultivo de ensayo en el salino (e.j. una cantidad de aproximadamente la medida de una cabeza de cerilla).
- Añadir a la suspensión 0.25ml de cada Reagente de Extracción 1 y 2 en orden. Tapar los tubos, mezclar la suspensión usando un mezclador vortex e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Después de 10 minutos añadir 0.25ml de Reagente de Extracción 3 y mezclar bien.
- Centrifugar el tubo durante 5 minutos a 7000rpm y usar el líquido sobrante como solución antígeno bacteriana para la sensibilización de las células rojas sanguíneas de polluelo.

B. Preparación de Células rojas sanguíneas de polluelo.

- Asegurarse que las células rojas sanguíneas designadas están completamente vueltas a suspender antes de usar para conseguir una homogeneidad uniforme, entonces dispensar 0.5ml en el número requerido de tubos de ensayo.

- Añadir 0.5ml de Solución Tampón y centrifugar la mezcla a 3000rpm durante 10 minutos.
- Cuidadosamente desechar el líquido sobrante y volver a suspender el sedimento en 0.5ml de solución tampón.
- C. Preparación de Células Rojas Sanguíneas Sensibilizadas de Polluelo.**
 - Tomar un tubo de centrifugado de 1.5ml y dispensar 0.5ml de solución de antígeno bacteriano para sensibilización seguida de 0.5ml de preparado designado de células rojas sanguíneas de polluelo. Tapar el tubo y mezclar bien, luego incubar a 37°C durante 30 minutos. Durante la incubación agitar el tubo a intervalos regulares. **Nota:** Asegurarse que las células rojas sanguíneas de polluelo designadas son completamente vueltas a suspender antes de usar para una uniformidad homogénea.
 - Después de 30 minutos de incubación, centrifugar el tubo a 6000rpm durante 30 segundos y desechar cuidadosamente el líquido sobrante.
 - Añadir 1.0ml de tampón y volver a suspender el sedimento usando un mezclador vortex. Esto debería ser ahora considerado como la suspensión de célula sensibilizada.

D. Procedimiento de Hemoaglutinación Pasiva.

- Dispensar 1 gota de cada antisuero en pocillos separados de una placa multipocillos de V- fondos según una plantilla previamente planeada. También, dispensar 1 gota del suero de referencia en un pocillo adicional como control.
- Dispensar 25µl de suspensión de célula sensibilizada en cada pocillo. Dejar que la suspensión de célula sensibilizada caiga libremente en el pocillo para no contaminarla con los antisueros.
- Mezclar suavemente los contenidos de los pocillos, colocar en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente durante 30 - 60 minutos.
- Después de 30 a 60 minutos comprobar cada pocillo para ver si hay aglutinación e interpretar los resultados según los criterios en la lista de abajo.

Interpretación de resultados

- El pocillo de control que contiene suero de referencia debería mostrar una aglutinación negativa p. ej. Las células rojas sanguíneas (RBC) deberían formar un botón hermético solamente en el centro del pocillo. Si el suero de referencia falla en dar una reacción negativa, debería volver a ser ensayado o la extracción del antígeno bacteriano vuelta a repetir.
- Los resultados para los antisueros de tipificación individuales deben ser interpretados según la siguiente tabla.

Resultado	Modelo	Interpretación
El sedimento de las RBC forma un botón hermético en el centro del pocillo.		-
Las RBC muestran algo de aglutinación pero no cubren la superficie del pocillo.		+
Las RBC aglutinan para cubrir la superficie completa del pocillo, pero todavía hay un botón de células visible en el centro del pocillo.		++
Completa aglutinación de RBC sin botón de células visible en el centro del pocillo.		+++

- Un aislado de bacteria que produce una reacción positiva inconfundible (+, ++ o +++) con un antisuero especificado se asume que es una cepa de *Campylobacter jejuni* en relación con los factores antígeno representados por ese grupo de antisuero. Si el aislado de bacteria produce una reacción positiva con más de un antisuero debería ser considerado como una cepa de tipo complejo.

Los antisueros son etiquetados según el sistema de agrupamiento y numeración Penner, como sigue:

Grupo A: 1, 44	Grupo K: 12	Grupo Y: 37
Grupo B: 2	Grupo L: 15	Grupo Z: 38
Grupo C: 3	Grupo N: 18	Grupo Z: 41
Grupo D: 4, 13, 16, 43, 50	Grupo O: 19	Grupo Z: 45
Grupo E: 5	Grupo P: 21	Grupo Z: 52
Grupo F: 6, 7	Grupo R: 23, 36, 53	Grupo Z: 55
Grupo G: 8	Grupo S: 27	Grupo Z: 57
Grupo I: 10	Grupo U: 31	Referencia
Grupo J: 11	Grupo V: 32	

Limitaciones de uso

Solamente los cultivos de microorganismos aislados por métodos convencionales y confirmados como *Campylobacter jejuni* por características morfológicas y bioquímicas pueden ser serotipados por este procedimiento. Todos los aislados deben crecer en placas de agar sangre a 42°C durante 48 horas bajo condiciones microaerófilas antes de comenzar los procedimientos.

Control de calidad

Se recomienda que el control de calidad se lleve a cabo con al menos un microorganismo que demuestre una reacción positiva y al menos otro que demuestre una reacción negativa. No usar el producto si las reacciones con los microorganismos de control son incorrectas. Comprobar si hay signos de deterioro. No usar reagentes si están contaminados o turbios.

Referencias

Bibliografía disponible si se requiere.