

MAST® ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER

Uso previsto

Antiseri liquidi stabili per la sierotipizzazione degli antigeni termostabili di *Campylobacter jejuni* mediante emoagglutinazione passiva.

MAST® ASSURE REAGENTS FOR PREPARATION OF SENSITISED RED BLOOD CELLS

Reagenti per l'estrazione di antigeni batterici e per l'accoppiamento degli antigeni estratti con globuli rossi di pollo. Devono essere utilizzati per la sierotipizzazione di *Campylobacter jejuni* con il metodo dell'emoagglutinazione passiva.

I MAST® ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER sono preparati da conigli iperimmunizzati con ceppi standard di microrganismi uccisi che possiedono sierotipi o antigeni gruppo-specifici noti. Contengono azide sodica 0,085% come conservante.

MAST® ASSURE ANTISERUM REAGENTS FOR PREPARATION OF SENSITISED RED BLOOD CELLS contiene le seguenti componenti:

1. Diluente dei campioni con globuli rossi di pollo fissati, pronto per l'uso. 1 x 25ml. Contiene eritrociti di pollo fissati in aldeide e sospesi in soluzione fisiologica.
2. Reagente di Estrazione 1, pronto per l'uso. 1x13ml. Contiene una soluzione di acido acetico.
3. Reagente di Estrazione 2, pronto per l'uso. 1x13ml. Contiene una soluzione di nitrato di sodio.
4. Reagente di Estrazione 3, pronto per l'uso. 1x13ml. Contiene una soluzione Tris tamponata.
5. Soluzione Tampone, pronta per l'uso. 2x50ml. Contiene una soluzione fisiologica fosfato tamponata.

Le componenti 1, 4 e 5 contengono azide sodica 0,085% come conservante.

Stabilità e Conservazione

Conservare nella confezione originale, ben sigillata, a 2 a 8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Dopo l'apertura, i MAST® ASSURE ANTISERUM devono essere conservati a 2 a 8°C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. **Non congelare i reagenti.**

Avvertenze e Precauzioni

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*. Rispettare le precauzioni di sicurezza ed impiegare tecniche asettiche. Deve essere utilizzato solo da personale di laboratorio opportunamente qualificato. Prima dell'eliminazione, sterilizzare tutti i materiali biologici pericolosi. Il conservante sodio azide può essere tossico per ingestione e può reagire con le tubazioni di piombo e rame formando sali altamente esplosivi. Smaltire irrorando sempre con abbondante acqua. Consultare la scheda di sicurezza del prodotto.

Materiali richiesti ma non forniti

Attrezzature e prodotti per analisi microbiologiche di base, per esempio: anse, stick applicatori, provette, tamponi, terreni di coltura MAST®, tamponi, inceneritori, termostati, ecc., come pure, specificatamente:

- Soluzione fisiologica sterile 0,85%
- Centrifuga capace di raggiungere 3000 rpm.
- Piastre con micropozzetti con fondo a V
- Camera umida
- I MAST® ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER devono essere utilizzati congiuntamente con MAST® ASSURE ANTISERUM REAGENTS FOR PREPARATION OF SENSITISED RED BLOOD CELLS (Cod.: M42201)
- I MAST® ASSURE ANTISERUM REAGENTS FOR PREPARATION OF SENSITISED RED BLOOD CELLS devono essere utilizzati con MAST® ASSURE ANTISERUM CAMPYLOBACTER.

Procedura

A. Estrazione di Antigeni Batterici

1. Dispensare 0,25ml di soluzione fisiologica sterile in una provetta per centrifuga da 1,5 ml.
2. Utilizzando un'ansa per batteriologia, emulsionare le cellule batteriche provenienti dalla coltura sperimentale in soluzione fisiologica (cioè una quantità simile alla dimensione di una capocchia di fiammifero).
3. Aggiungere alla sospensione 0,25 ml di Reagente di Estrazione 1 e 2, in sequenza. Tappare le provette, miscelare la sospensione utilizzando un miscelatore vortex e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
4. Dopo 10 minuti aggiungere 0,25 ml di Reagente di Estrazione 3 e miscelare con cura.
5. Centrifugare le provette per 5 minuti a 7000 rpm e utilizzare il surnatante come soluzione antigenica per sensibilizzare i globuli rossi di pollo.

B. Preparazione dei Globuli Rossi di Pollo

1. Prima dell'uso, verificare che i globuli rossi di pollo fissati siano accuratamente risospesi in modo omogeneo e uniforme. Dispensare quindi 0,5 ml nel numero di provette analitiche richiesto.
2. Aggiungere 0,5 ml di Soluzione Tampone e centrifugare la miscela a 3000 rpm per 10 minuti.
3. Scartare con cura il surnatante e risospingere il pellet in 0,5 ml di tampone.

C. Preparazione dei Globuli Rossi di Pollo Sensibilizzati

1. In una provetta per centrifuga da 1,5 ml dispensare 0,5 ml soluzione dell'antigene batterico per la sensibilizzazione seguita da 0,5 ml di globuli rossi

fissati di pollo. Tappare la provetta e miscelare con cura, quindi incubare a 37°C per 30 minuti. Durante l'incubazione agitare la provetta a intervalli regolari. **Nota:** Prima dell'uso, verificare che i globuli rossi di pollo fissati siano accuratamente risospesi in modo omogeneo e uniforme.

2. Dopo 30 minuti di incubazione, centrifugare la provetta a 6000 rpm per 30 secondi e scartare con cura il surnatante.
3. Aggiungere 1,0 ml di tampone e risospingere il pellet utilizzando un miscelatore vortex. Questa dovrà essere ora considerata la sospensione cellulare sensibilizzata.

D. Procedura di Emoagglutinazione Passiva

1. Dispensare 1 goccia di ciascun antisiero in pozzetti separati di una piastra con micropozzetti con fondo a V. Aggiungere quindi 1 goccia del siero di riferimento in un ulteriore pozzetto, come controllo.
2. Dispensare 25 µl di sospensione cellulare sensibilizzata in ciascun pozzetto. Lasciare che la sospensione cellulare sensibilizzata cada liberamente nel pozzetto per non contaminarla con gli antisieri.
3. Miscelare delicatamente il contenuto dei pozzetti utilizzando un miscelatore per micropiastre oppure a mano, e incubare in camera umida a temperatura ambiente per 30-60 minuti.
4. Dopo 30 a 60 minuti verificare ciascun pozzetto per valutare l'agglutinazione e interpretare i risultati secondo i criteri sotto elencati.

Interpretazione dei risultati

1. Il pozzetto di controllo contenente il siero di riferimento deve evidenziare un'agglutinazione negativa, cioè i globuli rossi (RBC) devono formare un bottone stretto al centro del pozzetto. Se il siero di riferimento non induce una reazione negativa deve essere nuovamente saggiato oppure sarà necessario ripetere l'estrazione dell'antigene batterico.
2. I risultati dei singoli antisieri di tipizzazione devono essere interpretati secondo la seguente tabella:

| Risultato | Modello | Interpretazione |
|--|---------|-----------------|
| Il sedimento degli RBC forma un bottone stretto nel centro del pozzetto | | - |
| Gli RBC evidenziano una qualche agglutinazione ma non coprono la superficie del pozzetto. | | + |
| L'agglutinato degli RBC tende a coprire completamente la superficie del pozzetto, ma si osserva ancora un bottone visibile al centro del pozzetto. | | ++ |
| Agglutinazione completa degli RBC senza alcun bottone visibile al centro del pozzetto. | | +++ |

3. Un isolato batterico, che genera una reazione chiaramente positiva (+, ++ o +++) con un antisiero, si presume possa essere un ceppo di *Campylobacter jejuni* che possiede fattori antigenici rappresentati dal quel antisiero di gruppo. Se l'isolato batterico genera una reazione positiva con più di un antisiero deve essere considerato come un ceppo di tipo complesso.

Gli antisieri sono etichettati secondo il sistema di numerazione e raggruppamento di Penner, come segue:

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

Limitazioni

Questo procedimento consente di sierotipizzare solo colture di microrganismi isolati con metodi convenzionali e identificati come *Campylobacter jejuni* per aspetto morfologico e con test biochimici. Prima dell'esecuzione del test, i ceppi isolati di *C. jejuni* devono essere coltivati su piastre di agar sangue a 42°C per 48 ore in microaerofilia.

Controllo Qualità

Il controllo di qualità deve essere eseguito impiegando almeno un microrganismo che mostri una reazione positiva ed almeno un microrganismo che mostri una reazione negativa. Non utilizzare il prodotto se le reazioni con i microrganismi di controllo non sono corrette. Verificare eventuali segni di deterioramento. Non utilizzare reagenti contaminati o torbidi.

Bibliografia

La pertinente bibliografia è disponibile su richiesta.