

ANWENDUNGSBEREICH

Die Vision-Antiseren von PRO-LAB sind zur Verwendung bei der serologischen Identifizierung von Organismen der Gattung *Salmonella* nach der Kauffmann-White Klassifikation (4) und für die Anwendung durch entsprechend geschultes Personal bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Die Gattung *Salmonella* enthält eine große Zahl mensch- und tierpathogener Arten. Eine vollständige Identifizierung von *Salmonellen* erfordert die Anzuchtisolation, biochemische Charakterisierung und die serologische Identifizierung (Serotypisierung).

Polyvalente „O“ (somatische)-Antiseren sollen die Eingangs-Serotypisierung unterstützen, während eine vollständige Identifizierung der „O“-Antigene mit monovalenten spezifischen „O“-Antiseren erreicht werden kann (1). Der Serotyp von *Salmonellen*-Isolaten kann dann mithilfe von polyvalenten und monovalenten „H“(Flagellen)-Antiseren bestimmt werden (1, 2).

Die serologische Identifizierung von *Salmonellen* umfasst das Mischen des mutmaßlichen Organismus mit Antiserum, das spezielle Antikörper gegen *Salmonellen* enthält. Bei Vorhandensein von homologem Antiserum kommt es zu einer Agglutination (Verklumpung) der Bakterien.

REAGENZIEN

Die polyvalenten und monovalenten „O“ und „H“-Antiseren gegen *Salmonellen* von PRO-LAB werden unter Verwendung von Referenzstämmen nach den von der WHO empfohlenen Verfahren in Kaninchen hergestellt (3, 4) und zur Eliminierung von Kreuzreaktionen absorbiert.

Die Antiseren von PRO-LAB befinden sich in einem Tropfenspender mit 3,0 ml gebrauchsfertigem, verdünntem Antiserum und 0,01% Thimerosal als Konservierungsmittel.

VORSICHTSMAßNAHMEN

- Die Antiseren nach Ablauf des auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr einsetzen.
- Das Antiserum enthält Thimerosal, eine hochgiftige, quecksilberhaltige Verbindung. Obgleich die Antiseren nur minimale Mengen Thimerosal enthalten, sollten beim Umgang mit den Reagenzien und bei deren Einsatz und Entsorgung entsprechende Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden.
- Das Reagenzfläschchen darf nicht kontaminiert werden.
- Die Testproben können Organismen enthalten, die für den Menschen pathogen sind, und sollten deshalb als infektiöses Material angesehen und entsprechend behandelt werden.
- Das Reagenz ist ausschließlich für den Einsatz in der *in-vitro*-Diagnostik konzipiert.
- Alle in dieser Testanleitung enthaltenen Hinweise zur Testdurchführung und -aufbewahrung sowie zu Vorsichtsmaßnahmen und Verfahrenseinschränkungen müssen genau befolgt werden, um gültige Ergebnisse zu erzielen.
- Das Produkt enthält Materialien tierischer Herkunft und sollte wie ein potenzieller Träger und Überträger von Krankheiten gehandhabt werden.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Glasobjektträger oder Teströhrchen
 Physiologische Salzlösung (0,85% Natriumchlorid-Lösung).
 Einweg-Impfösen oder Impfösen aus Draht.
 Wasserbad mit einer Temperatur von 51°C.
 Mikroskop

STABILITÄT UND LAGERUNG

Die *Salmonellen*-Antiseren sollten bei 2-8°C aufbewahrt werden. Nicht einfrieren. Unter diesen Bedingungen sind die Antiseren bis zu dem auf der Packung angegebenen Datum haltbar.

PROBENGEWINNUNG UND KULTURVORBEREITUNG

Zur genauen Anleitung der Probengewinnung und Herstellung einer Primärkultur sollte mikrobiologische Standardliteratur herangezogen werden. Kolonien, die auf Agar zur Differenzierung von enterischen Keimen isoliert werden und bei denen es sich um *Salmonellen* handeln könnte, sollten anhand der üblichen biochemischen Tests bestätigt werden. Zur Anzucht von Kolonien zur Identifizierung von somatischem „O“-Antigen empfehlen sich schwache Selektionsmedien, z.B. Butagar oder Nährstoffagar. Zur Identifizierung des Flagellenantigens „H“ sollte die Kultur am Besten aus Flüssigphasen angelegt werden.

VERFAHREN

A. Identifizierung von somatischem *Salmonellen*-Antigen und Vi-Antigen (Objektträgertest):

- Geben Sie zwei einzelne Impfösen mit normaler Salzlösung (0,85% Natriumchlorid) auf einen sauberen Objektträger.
- Entnehmen Sie aus einer Übernachtskultur einen kleinen Teil einer vermutlichen *Salmonellen*-Kolonie und mischen Sie diesen gründlich mit beiden Tropfen der physiologischen Kochsalzlösung auf dem Objektträger, um eine glatte Suspension zu erhalten.
- Geben Sie zu einem der beiden Tropfen mit Bakteriensuspension auf dem Objektträger eine Impföse mit Antiserum und zu dem anderen Tropfen (Kontrolle) eine Impföse mit physiologischer Kochsalzlösung.
- Mischen Sie das Antiserum und die Bakteriensuspension mit einem Zahnstocher.
- Schwenken Sie den Objektträger eine Minute lang vorsichtig und beobachten Sie unter normalen Lichtverhältnissen oder in einem schwach vergrößerndem Objektiv, ob es zu einer Agglutination kommt.

B. Identifizierung des Flagellenantigens „H“ von *Salmonellen* (Objektträgertest):

Die Vorgehensweise entspricht dem Verfahren zur Identifizierung des somatischen Antigens, außer dass die Flüssigphase aus einem halbfesten Medium in einem Craigie-Röhrchen (1) oder aus der Flüssigkeit auf Schrägagar verwendet wird. Bei Verwendung einer Flüssigkultur muss keine Suspension in Salzlösung hergestellt werden. Der Nachweis von Flagellenantigen erfolgt in der Regel im Objektträger-Agglutinationstest, allerdings sind manche Stämme flagellenarm und sind daher möglicherweise nur in Agglutinationstests in Reagenzröhrchen nachweisbar.

C. Identifizierung von somatischem Antigen, Vi-Antigen und „H“-Antigen von *Salmonellen* (Röhrchentest):

- Herstellung von Zellsuspensionen für den Test: Stellen Sie eine dichte Bakteriensuspension in normaler Kochsalzlösung her und kochen sie diese 10 Minuten lang oder verwenden Sie eine Suspension aus mit Alkohol dehydrierten Zellen in Kochsalzlösung für Browns-Röhrchen 2 zur Identifizierung von somatischen Antigenen. Zur Identifizierung von „H“-Antigen stellen Sie eine formalisierte, abgetötete Suspensionskultur her. Zur Identifizierung von „Vi“-Antigen suspendieren Sie mögliche „Vi“-Kolonien in 0,5% formaler Salzlösung in Browns-Röhrchen 2.

- Verdünnung der Antiseren: Zur Verwendung der *Salmonellen*-Antiseren von PRO-LAB in einem Teströhrchen muss jedes Antiserum vor dem Gebrauch 1:5 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden.
- Geben Sie 150 µl in physiologische Kochsalzlösung in ein Reagenzröhrchen aus Glas und geben Sie das gleiche Volumen an verdünntem Antiserum in ein zweites Röhrchen.
- Geben Sie in jedes Röhrchen das gleiche Volumen von den zuvor hergestellten Zellsuspensionen.
- Inkubieren Sie die Mischung zur Identifizierung von Flagellenantigen 2 Stunden lang im Wasserbad bei 51°C bzw. 5 bis 18 Stunden lang zur Identifizierung von somatischem Antigen oder „Vi“-Antigen.
- Überprüfen Sie die Röhrchen auf Agglutination.

D. Identifizierung des *Salmonella*-Flagellenantigens „H“ mithilfe der *Salmonellen* seren zur Schnelldiagnostik.

Zum Nachweis der Flagellengruppe wird eine Kombination der *Salmonellen*seren zur Schnelldiagnostik verwendet.

- Die Vorgehensweise zur Identifizierung des *Salmonella*-Flagellenantigens „H“ im Objektträger-Test entspricht Verfahren B.
- Die Vorgehensweise zur Identifizierung des *Salmonella*-Flagellenantigens „H“ im Teströhrchen entspricht Verfahren C.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

- Für Verfahren A oder B:**
Eine eindeutige Agglutination (granuläre Verklumpung) innerhalb von 60 Sekunden ohne Agglutination in der Negativkontrolle (Autoagglutination) gilt als positives Ergebnis. Positive Ergebnisse können im Röhrchen-Agglutinationstest betätigt werden.
- Für Verfahren C:**
Bei der Identifizierung von „O“-Antigen gilt das Vorhandensein granularer Klumpen im Röhrchen als positives Ergebnis, während bei der Identifizierung von „H“-Antigen das Vorhandensein von Flocken, betrachtet in hellem Licht vor einem dunklen Hintergrund, als positives Ergebnis gilt.
- Für Verfahren D:**
 - Im Objektträgertest werden positive Ergebnisse wie in 1 ausgewertet.
 - Im Röhrchentest werden positive Ergebnisse wie in 2 ausgewertet.
 - Zur Auswertung der Ergebnisse der *Salmonellen* seren 1 bis 3 zur Schnelldiagnostik wird folgende Tabelle herangezogen:

Seren	<i>Salmonellen</i> -Flagellengruppe						
	b	d	E	G	k	L	r
<i>Salmonellen</i> serum 1 zur Schnelldiagnostik	+	+	+	-	-	-	+
<i>Salmonellen</i> serum 2 zur Schnelldiagnostik	+	-	+	-	+	+	-
<i>Salmonellen</i> serum 3 zur Schnelldiagnostik	-	+	+	+	+	-	-



VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Antiseren sollten nur zur Identifizierung von Kulturen verwendet werden, die zuvor biochemisch als *Salmonellen* charakterisiert wurden. Das Vorhandensein ähnlicher Antigene auf der Oberfläche von Bakterien, bei denen es sich nicht um *Salmonellen* handelt, ist nicht getestet worden und kann zu falschen Ergebnissen führen.
2. Bei rauhen Stämmen kommt es durch Autoagglutination zu falsch positiven Ergebnissen. In jedem Test sollte eine Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung mitgeführt werden, um die Spezifität der Reaktion zu gewährleisten.
3. Es empfiehlt sich, die Wirksamkeit des *Salmonellen*-Antiserums anhand von Stammkulturen mit bestimmter Antigenstruktur zu überprüfen.
4. Obgleich die meisten *Salmonellen*-Stämme, die die entsprechenden Antigene tragen, mit dem homologen Antiserum agglutinieren, kann dies nicht in allen Fällen garantiert werden; dies ist auf geringfügige Unterschiede beispielsweise der Antigenexpression zwischen Stämmen desselben Serotyps und einzelnen Kolonien aufgrund einer Formvariation zurückzuführen (Ref. 5).
5. Die Sensitivität des Objektträgertests verringert sich, wenn Volumina über 10 µl verwendet werden.

LITERATUR:

1. **Ewing, W.H.** 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4. Auflage. Elsevier Science Publishing Co., New York.
2. **Spicer, C.C.** 1956. J. Clin. Path. 9: 378.
3. **World Health Organization, Centre for Reference and Research on Salmonella.** Antigenic formulae of the salmonella serovars 1992. WHO International *Salmonella* Centre, Institut Pasteur, Paris.
4. **Kauffmann, F.** 2001. The Bacteriology of Enterobacteriaceae. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
5. **Bergan T.** (Ed). 1984 Methods in Microbiology. Band 15. Serology of *Salmonella*. Lindberg A, Minor L 1-141.

ERHÄLTLICHE REAGENZIEN

Polyvalente somatische „O“-Antiseren:

PL.6000 Polyvalent O A - I + VI
PL.6002 Polyvalent O A - S

Monovalente somatische „O“-Antiseren:

PL.6010 Gruppe A, Faktor 2
PL.6011 Gruppe B, Faktor 4
PL.6012 Gruppe B, Faktor 5
PL.6013 Gruppe C, Faktor 6,7
PL.6014 Gruppe C2, Faktor 8
PL.6015 Gruppe D, Faktor 9
PL.6016 Gruppe B/D, Faktor 12
PL.6017 Gruppe E, Faktor 3,10,15,19,34
PL.6018 Gruppe E1, Faktor 10
PL.6019 Gruppe E2, Faktor 15
PL.6020 Gruppe E4, Faktor 19
PL.6021 Gruppe E3, Faktor 34
PL.6022 Gruppe F, Faktor 11
PL.6023 Gruppe G, Faktor 13,22,23
PL.6024 Gruppe G1, Faktor 22
PL.6025 Gruppe G2, Faktor 23
PL.6027 Gruppe C3, Faktor 20
PL.6029 Gruppe I, Faktor 16
PL.6030 Gruppe J, Faktor 17
PL.6031 Gruppe K, Faktor 18
PL.6032 Gruppe L, Faktor 21
PL.6033 Gruppe M, Faktor 28
PL.6034 Gruppe N, Faktor 30
PL.6035 Gruppe O, Faktor 35

PL.6036 Gruppe P, Faktor 38
PL.6037 Gruppe Q, Faktor 39
PL.6038 Gruppe R, Faktor 40
PL.6039 Gruppe S, Faktor 41
PL.6040 Vi
PL.6041 Factor 55

Polyvalente Flagellenantigen „H“-Antiseren:

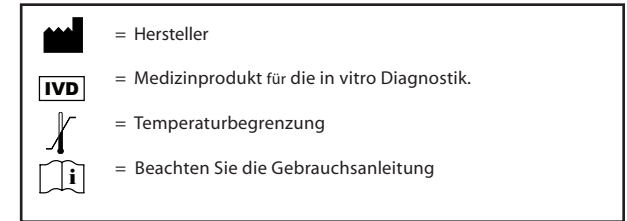
PL.6100 Polyvalent H
PL.6101 Polyvalent H Phase 2, Faktoren 1,2,5,6,7,z6

Monovalente Flagellenantigen „H“-Antiseren:

PL.6110 Faktor a
PL.6111 Faktor b
PL.6112 Faktor c
PL.6113 Faktor d
PL.6114 E-Komplex eh, enx, enz15
PL.6115 Faktor eh
PL.6116 Faktor enz
PL.6117 Faktor enz15
PL.6118 Faktor h
PL.6120 Faktor z15
PL.6121 G-Komplex
PL.6122 Faktor gm
PL.6123 Faktor gp
PL.6124 Faktor p
PL.6125 Faktor u
PL.6126 Faktor s
PL.6127 Faktor m
PL.6128 Faktor t
PL.6129 Faktor f
PL.6131 Faktor q
PL.6133 Faktor i
PL.6134 Faktor k
PL.6135 L-Komplex
PL.6136 Faktor l, w
PL.6137 Faktor l, v
PL.6138 Faktor w
PL.6139 Faktor v
PL.6140 Faktor z13
PL.6141 Faktor z28
PL.6142 Faktor r
PL.6143 Faktor y
PL.6144 Faktor z
PL.6145 Z4-Komplex
PL.6146 Faktor z23
PL.6147 Faktor z24
PL.6148 Faktor z32
PL.6149 Faktor z10
PL.6151 Faktor z29
PL.6153 Faktor 2
PL.6154 Faktor 5
PL.6155 Faktor 6
PL.6156 Faktor 7
PL.6157 Faktor z6

Salmonellen seren zur Schnelldiagnostik

PL.6200 *Salmonellen* serum 1 zur Schnelldiagnostik
PL.6201 *Salmonellen* serum 2 zur Schnelldiagnostik
PL.6202 *Salmonellen* serum 3 zur Schnelldiagnostik



Bei diesen Anleitungen handelt es sich um eine Fachübersetzung der englischen Originalversion. Bei Unklarheiten oder offensichtlichen Abweichungen wenden Sie sich bitte an Pro-Lab.