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

Testreagens for slideagglutinasjon og faseinversjon (phase reversal, PR)

INFORMASJON FOR FAGPERSONELL

CE IVD

no

Tilsiktet bruk
Anti-Salmonella H testseraene brukes til å påvise eller fastslå *salmonella*stammers H-antigener i henhold til White-Kauffmann-Le-Minor (Kaufmann-White-systemet) ved hjelp av slideagglutinasjon. Med disse bestemmes serovartypen.
Testseraene som er avkrysset i tabellen nedenfor kan også brukes på tofasestammer for å indusere den ikke-påviste H-fasen (faseinversjon av bakteriekultur på sværmagarplate (swarm agar)/Sven Gard-metoden).

Testprinsipp
Dersom *salmonella*stammen besitter et H-antigen som testserumet dekker, så vil dette antigenet bli bundet når det blandes med det spesifikke antistoffet. Antigen-antistoff-reaksjonen resulterer i klart synlig agglutinasjon for denne stammen.

Sammensetning
Testreagensene er monoklonale antistoffer, testsera eller en blanding av monoklonale antistoffer og testserum. Monoklonale antistoffer lages fra supernatant av en cellekultur av hybridoma-cellelinjer som utskiller antistoff mot de respektive *salmonella* H-antigenene. Testseraene er immuniserte kaninsera der uspesifikke agglutininer har blitt fjernet ved absorpsjon.
Konserveringsmiddel: natriumazid (NaN_3) 0,9 mg/ml

Tilgjengelige Anti-Salmonella varelinjer

Type	Antigen som påvises	faseinversjon (PR)
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	alle antigenkombinasjonene av H:G kompleks, unntatt H:m,t	x
H:g,m	alle antigenkombinasjonene av H:G kompleks, inklusivt 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)] påviser H:z i underartene I, II og III

Produktets form ved levering, holdbarhet og lagringsbetingelser
Testreagenser som stadig vekk benyttes ved mikrobiologiske laboratorier, er tilgjengelig i flytende form og bruksklare. Testreagenser som benyttes mer sjelden er lyofilisert (frysetørret).
Flytende testreagenser er opprinnelig forseglet og kan brukes frem til den datoen som er angitt på etiketten dersom de lagres ved 2...8 °C både før og etter at de er blitt åpnet. Flaskene må lukkes skikkelig etter bruk.
Lyofilisert (frysetørret) testreagens må løses i 1 ml eller 5 ml destillert vann før bruk – se anvisning. Flasken lukkes skikkelig med medfølgende dråpetellerkork. Ved oppbevaring ved 2...8 °C kan de brukes i minst 18 måneder, men de må imidlertid ikke brukes etter utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
Testseraene kan noen ganger være blakket selv i fravær av mikrober. Slik turbiditet har ingen innflytelse på testegenskapene; turbiditeten kan fjernes ved sentrifugering eller filtrering. Før bruk må testreagensene oppnå romtemperatur (18...26 °C).

Advarsler og forholdsregler
Den bioteknologiske fremstillingen av testreagens innebærer at risikoen for kontaminasjon av infeksiøse agens kan så godt som utelukkes. Men fordi de inneholder animalsk materiale (føtalt kalveserum, stabilisator) bør de behandles som potensielt infeksiøse og håndteres deretter. Testreagenser som inneholder biologisk materiale i form av kaninserum må derfor anses som potensielt infeksiøst og behandles deretter. Da disse materialene inneholder natriumazid, må kontakt med hud og slimhinner unngås. I tilfelle kontakt må det skylles med rikelig bruk av vann. Siden slideagglutinasjon innebærer arbeid med naturlig forekommende patogene materialer, må alle nødvendige beskyttelsesprosedyrer følges (infeksjonsrisiko)!

Materialer og utstyr som ikke medfølger
Objektglass, rørepinner, fysiologisk saltvann (9 g/l NaCl), avfallsbeholder for infeksiøst materiale, White-Kauffmann-Le-Minor-skjema, sterile petriskåler (diameter: 6 cm), sværmagar, mikrobølgeovn eller vannbad, termometer.

Testmateriell og metode
1. Identifisering av antigen
1.1 Ta en liten mengde bakteriemasse fra en 16-20 timer gammel subkultur (for eksempel fra næringsagar eller Kligler dyrkningsmedium), plukket fra det nedre, fuktigere området av agarskråflaten. Overfør dette til et objektglass og bland godt med en dråpe (ca. 25 µl) Anti-Salmonella H testreagens, slik at man får en homogen og svakt melkeaktig suspensjon. Objektglasset bør plasseres mot en mørk bakgrunn. Resultatet avleses visuelt ved å holde objektglasset foran en lyskilde mot en svart bakgrunn, mens det vippes frem og tilbake. For å kontrollere for spontan agglutinasjon, må en negativ kontroll settes opp parallelt. Til dette benyttes fysiologisk saltvann istedenfor testreagenset.
1.2 Gelingt Dersom H-antigen-testen, utført slik det er beskrevet ovenfor, ikke er vellykket, må stammen inokuleres på sværmagar for å fremme utvikling av flagellantigener. Som sværmagar anbefaler vi vårt bruksklare dyrkningsmedium sifin REF TN 1702. Sværmagaren gjøres flytende og 10 ml helles i en petriskål (6 cm diameter). Når den har størknet, vætes overflaten med ca. 100 µl sterilt, destillert vann, og stammen punktavsettes midt på skålen. Inkuber skålen ved 35...37 °C over natt med agaren vendt ned. Når slideagglutinasjonen utføres, benyttes materiale fra skålens randsone.
2. Faseinversjon
Dersom stammen har to faser, men man bare er i stand til å identifisere den ene H-fasen, må man benytte faseinversjon (Sven Gard-metoden) for å indusere den andre fasen.
2.1. Bland 0,1-0,2 ml Anti-Salmonella H testreagens med 10 ml flytende sværmagar (kjølt ned til 40...45 °C) i en petriskål med diameter på 6 cm. Etter at agaren har størknet, vætes overflaten med destillert vann (som beskrevet i pkt. 1.2.). Inokuler med salmonellastammen, inkuber den og utfør slideagglutinasjon. Dersom faseinversjonen mislykkes, må prosedyren gjentas
2.2. Alternativt til denne klassiske prosedyren, anbefaler vi følgende forenklede prosedyre: Tilsett 0,1 ml Anti-Salmonella H testreagens dråpevis til en skål (diameter: 6 cm) med 10 ml sværmagar, og spre så med en steril øse. Deretter inokulerer man på midten av skålen og inkuberer som beskrevet ovenfor. Etter 16-20 timer kan den svermende stammen benyttes til å identifisere den andre H-fasen. Denne forenklede prosedyren gjør det vanligvis mulig å identifisere den andre fasen ved første forsøk.

Tolking
Testresultatene kan kun vurderes dersom den negative kontrollen forblir melkeaktig/ugjennomsiktig
Positiv: Synlig agglutinasjon etter at prøven har blitt vippet frem og tilbake mindre enn 20 ganger. Sterke positive reaksjoner viser agglutinasjon (grovt eller finere flokkulert) så snart bakteriemassen tilsettes. Svake positive resultater viser agglutinasjon først etter at sliden har vært vippet frem og tilbake 10-20 ganger.
Negativ: Resultatet er negativt dersom suspensjonen forblir melkeaktig/ugjennomsiktig, eller dersom reaksjonen ikke opptrer før sliden har vært vippet frem og tilbake mer enn 20 ganger.

Kvalitetssikring ved gjennomføring av testen
For kvalitetskontroll av den serologiske typifiseringen ved hjelp av slideagglutinasjon (agglutinasjon på objektglass), er det viktig at stammene som brukes for dette uttrykker sitt antigen godt på cellens overflate. Til kvalitetskontroll anbefales det derfor å bruke stammer fra koordinerte forsøk, eksterne fullstendig karakteriserte feltstammer av definert opprinnelse, eller egnede *salmonella* O, H-testantigener, som kan fås som handelsvare.

Metodens begrensninger
Testreagensene reagerer kun med *salmonella*stammer som inneholder antigenspesifisitetene som nevnes i dette pakningsvedlegget.
Kryssreaksjoner med stammer tilhørende andre slekter innen familien *Enterobacteriaceae* har ikke vært påvist.
Identifikasjon av H-antigen oppnås ved serologisk identifisering av O-antigen og biokjemiske henvisning til *salmonella*slekten.

Symbolforklaringer

LOT LOT-nummer
REF Artikkelnummer
IVD Medisinsk In vitro diagnostisk produkt
TR Testreagens
mTR Monoklonalt testreagens
PI Faseinversjon (phase reversal)

Bruk før YYYY-MM (MM = slutten av måneden)
Temperaturgrenser
Se brukerveiledning
Agglutinasjon på objektglass
LYO Lyofilisert

Revisjonsdato: 10/09/2019

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

Контрольний реагент для реакції аглютинації на предметному склі та фазової індукції (PI)

ІНФОРМАЦІЯ ПРИЗНАЧЕНА ДЛЯ КВАЛІФІКОВАНОГО ПЕРСОНАЛУ

CE IVD

uk

Призначення
Контрольні реагенти Anti-Salmonella H призначені для виявлення або підтвердження H-антигенів штамів сальмонели за скороченою схемою Уайта-Кауфмана шляхом аглютинації на предметному склі. Вони дозволяють визначити серовар. Тестові реагенти, зазначені в наведеній нижче таблиці, можуть використовуватися для двофазної індукції штамів, а також для індукції невизначеної H-фази (метод «загальмованого роїння» Свена Гарда).

Принцип тестування
Якщо штам сальмонели містить антиген, що відповідає діапазону тестового реагента H-антигена, при змішуванні він зв'язується із специфічним антитілом. Після реакції між антигеном і антитілом можна спостерігати очевидну аглютинацію штаму.

Склад
Тестові реагенти – це моноклональні антитіла, сироватки або суміш моноклональних антитіл та сироватки для тестування. Моноклональні антитіла виготовляються з рідкої фази клітинних культур гібридної клітинної лінії, яка виробляє антитіла проти відповідного антигену сальмонели H. Сироватки для проведення тесту – це сироватки від імунізованих кроликів, шляхом абсорбції очищені від неспецифічних аглютинінів.
Консервант: азид натрію (NaN_3) 0,9 мг/мл

Доступні специфічності Anti-Salmonella

Специфічність	Підтверджені антигени	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	всі комбінації антигенів комплексу H:G окрім H:m,t	x
H:g,m	всі комбінації антигенів комплексу H:G, включаючи 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)] розпізнає H:z для субспецифічностей I, II і III

Спосіб застосування, термін і умови зберігання
Тестові реагенти, які часто застосовуються у мікробіологічній практиці, випускаються в рідкій формі, готовими до використання, тестові реагенти для специфічності випускаються у ліофілізованій формі.
Рідкі тестові реагенти зберігаються у флаконі в первинному вигляді, після першого відкривання мають зберігатися за температури 2–8 °C і можуть використовуватися до дати, указаної на етикетці. Після використання флакон необхідно щільно закрити.
Ліофілізовані тестові реагенти перед використанням потрібно розвести в 1 мл або 5 мл дистильованої води відповідно до інструкції і добре закрити за допомогою кришки з піпеткою, що входить у комплект постачання.
При зберіганні при температурі 2 - 8 °C вони можуть використовуватися протягом 18 місяців, але не пізніше дати, зазначеної на упаковці.
Час від часу в тестових реагентах може спостерігатися помутніння немікробного походження. Воно не впливає на ефективність реагентів і може бути усунене шляхом центрифугування або фільтрації. Перед використанням тестовий реагент має нагрітися до кімнатної температури (18...26 °C).

Попередження та заходи безпеки
Завдяки біотехнологічному виробництву тестових реагентів ризик зараження збудниками інфекційних захворювань майже виключений. Через вміст матеріалів тваринного походження (ембріональна теляча сироватка, стабілізатор) з реагентами потрібно поводитися як із потенційно інфекційними. Тестові реагенти, що містять біологічний матеріал у вигляді сироватки кролика, повинні розглядатися як потенційно інфекційні та використовуватися відповідним чином.
Через вміст азиду натрію слід уникати контакту зі шкірою та слизовими оболонками; у разі контакту слід промити уражене місце під струменем води. Оскільки під час реакції аглютинації на предметному склі робота виконується з використанням природних матеріалів збудників захворювань, необхідно дотримуватися відповідних заходів техніки безпеки (небезпека зараження!).

Робочі матеріали й обладнання, що не входять до комплекту постачання
Предметне скло, паличка для перемішування, фізіологічний сольовий розчин (9,0 г/л NaCl), контейнер для утилізації інфекційного матеріалу, скорочена схема Уайта-Кауфмана, стерильні чашки Петрі (діаметр 6 см), агар роїння, мікрохвильова піч або водяна баня, термометр.

Досліджуваний матеріал і методика
1. Визначення антигену
1.1 Візьміть зразок бактеріальної маси з нижньої вологої частки агару роїння з 16-20-годинної допоміжної культури (наприклад, поживного агару або середовища Кліглера) та розмішайте його на предметному склі в краплі тестового реагенту (близько 25 мкл) Anti-Salmonella H до утворення однорідної, злегка молочної суспензії. Предметне скло має лежати на темній підставці. Помістіть предметне скло перед джерелом світла на чорному тлі, поверніть його та зчитайте результат неозброєним оком. Щоб виключити спонтанні аглютинації, проведіть негативний контрольний тест з використанням фізіологічного сольового розчину замість тестового реагенту.
1.2 Якщо визначення H-антигену за даною методикою пройшло невдало, штам пересівають на агар роїння для кращого прояву джгутикового антигену. Для агару роїння рекомендується використовувати готове поживне середовище sifin REF TN 1702. 10 мл цього агару роїння після розрідження слід додати до чашки Петрі діаметром 6 см. Після застигання агару змочіть поверхню приблизно 100 мкл стерильної дистильованої води і точково нанесіть штам посередині пластини. Інкубуйте пластину до наступного дня при температурі 35-37 °C, при цьому шар агару має бути повернений донизу. Для реакції аглютинації на предметному склі матеріал беруть з краю пластини.
2. Фазова індукція
Для двофазних штамів, у яких визначається тільки одна H-фаза, для індукції другої фази застосовується метод загальмованого роїння Свена Гарда.
2.1. В чашці Петрі діаметром 6 см змішайте 0,1 - 0,2 мл тестового реагенту Anti-Salmonella H з 10 мл розрідженого і охолодженого до 40-45°C агару роїння. Після застигання агару змочіть поверхню стерильною дистильованою водою, як зазначено в п. 1.2, потім нанесіть штам сальмонели, інкубуйте матеріал і проведіть аглютинацію на предметному склі. Якщо індукція другої фази пройшла невдало, процедуру слід повторити.
2.2. Паралельно з традиційним методом ми радимо застосовувати спрощений метод. На пластину діаметром 6 см нанесіть 10 мл агару роїння, додайте до нього по краплі 0,1-0,2 мл тестового реагенту Anti-Salmonella H і розподіліть по поверхні скляним шпателем. Після цього середину пластини засійте та інкубуйте, як зазначено вище. Через 16-20 годин штам можна використовувати для
ідентифікації другої, не загальмованої H-фази. Спрощений метод, як правило, дозволяє виявити другу фазу з першої спроби.

Оцінка результату
Оцінку можна виконати, лише якщо після негативного контрольного тесту зразок зберігає молочно-мутний вигляд.
Позитивний: видима аглютинація після 1-20 збовтувань. У разі інтенсивної позитивної реакції аглютинація (великі або маленькі утворення) відбувається вже під час розмішування бактеріальної маси. У разі слабкої позитивної реакції результат з'являється лише після 10-20 збовтувань.
Негативний: суспензія залишається молочно-мутною на вигляд, або після понад 20 збовтувань демонструється негативна реакція.

Забезпечення якості при проведенні тесту
Для контролю якості серологічної типізації шляхом аглютинації на предметному склі важливо, щоб використовувані для цього штами добре виділяли свої антигени на поверхні клітини. Тому для контролю якості рекомендується використовувати штами з міжлабораторних випробувань або повністю охарактеризовані в незалежній лабораторії польові штами уточненого генезу чи відповідні комерційно доступні тестові O-антигени чи H-антигени *сальмонели*.

Обмеження методу
Тестові реагенти реагують тільки зі штамами *сальмонели*, які містять специфічний заявлений антиген. Перехресні реакції з штамами інших видів сімейства *Enterobacteriaceae* підтверджені не були. Визначення H-антигенів виходить із серологічного визначення O-антигену(-ів) та біохімічного визначення належності до роду*Salmonella*.

Опис використаних символів

LOT Номер партії (позначення партії)
REF Номер замовлення
IVD Діагностика in vitro
TR Тестовий реагент
mTR Моноклональний тестовий реагент
PI Фазова індукція

Можна використати до РРРР-ММ (ММ = кінець місяця)
Температурне обмеження
Дотримуйтеся інструкції з використання
Аглютинація на предметному склі
LYO Ліофілізований

Дата редакції: 10/09/2019

sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | www.sifin.de