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

Testreagenz für die Objektträgeragglutination und Phaseninduktion (PI)

INFORMATION ZUM GEBRAUCH DURCH FACHPERSONAL

CE IVD

es

Uso previsto
Los reactivos de ensayo se utilizan para identificar o verificar los antígenos H de cepas de Salmonella de acuerdo con el esquema White-Kauffmann-Le-Minor (esquema White-Schema) mediante la prueba de aglutinación en portaobjetos. Permiten identificar el serovar. Los reactivos de ensayo indicados en la siguiente tabla también se pueden utilizar en caso de cepas bifásicas para la inducción de la fase H indetectable (procedimiento de inversión de fase según Sven Gard).

Principio del ensayo
Si la cepa de *Salmonella* posee un antígeno H correspondiente al rango de detección del reactivo de ensayo, este se ligará al anticuerpo específico al realizar la mezcla. Como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo la cepa se ve claramente aglutinada.

Composición
Los reactivos de ensayo son anticuerpos monoclonales, sueros de ensayo o una mezcla de anticuerpos monoclonales y suero de ensayo. Estos se forman a partir de sobrenadantes de cultivos de células de líneas celulares de hibridomas que secretan anticuerpos contra los antígenos de *Salmonella* H correspondientes. Los sueros de ensayo son sueros de conejos inmunizados liberados a través de la absorción de aglutininas no específicas.
Conservante: azida sódica (NaN_3) 0,9 mg/ml

Especificidades disponibles Anti-Salmonella

Especificidad	Antígenos detectados	IF
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 las combinaciones de antígenos del complejo H:G excepto H:m,t	x
H:g,m	todas las combinaciones de antígenos del complejo H:G incluida 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)] Identifica H:z en las subespecies I, II y III

Forma galénica, vida útil y condiciones de almacenamiento
Los reactivos de ensayo frecuentes en la práctica microbiológica son líquidos y están listos para su uso. Los reactivos de ensayo para especificidades de menor consumo están liofilizados.
Si los reactivos de ensayo **líquidos** se almacenan sin abrir su embalaje original a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C, se podrán utilizar hasta la fecha indicada en la etiqueta. Tras utilizar la, esta debe volver a cerrarse bien.
Deben diluirse, de conformidad con la declaración, en 1 ml o 5 ml de agua destilada antes de su uso y cerrarse bien con la pipeta cuentagotas. Si se almacenan a entre 2 °C y 8 °C podrán utilizarse, como mínimo, durante 18 meses.
Sin embargo, no deberán utilizarse nunca transcurrida la fecha que aparece en la etiqueta.
En ocasiones puede que los reactivos de ensayo presenten turbidez de origen no microbiano. Sin embargo, la turbidez no disminuye el efecto de los reactivos de ensayo y puede eliminarse mediante centrifugación o filtración.
Antes de utilizar los reactivos de ensayo, los mismos deben aclimatarse a temperatura ambiente (entre 18 °C y 26 °C).

Advertencias y precauciones de uso
Debido a la preparación biotecnológica de los reactivos de ensayo, el riesgo de contaminación por agentes patógenos infecciosos es prácticamente nulo. Puesto que contienen material animal (suero fetal de ternera, estabilizadores), deberían manipularse como productos potencialmente infecciosos. Los reactivos de ensayo, que contienen material biológico en forma de suero de conejo, deberían considerarse como potencialmente infecciosos y manipularse como tales. Además, puesto que contienen azida de sodio, debe evitarse que entren en contacto con la piel y las mucosas. Si lo hicieran, lavar con agua abundante. Para realizar la prueba de aglutinación en portaobjetos se trabaja con materiales patógenos nativos, por lo que deberán respetarse las medidas de seguridad laboral (riesgo de infección).

Materiales de trabajo y equipos no suministrados
Portaobjetos de vidrio, agitador, suero fisiológico (9,0 g/l NaCl), contenedores para desechar materiales infecciosos, esquema de White-Kauffmann-Le-Minor, placas de Petri estériles (de 6 cm de diámetro), agar de cobertera, microondas o baño maría, termómetro.

Material de ensayo y metodología
1. Determinación de los antígenos
1.1 Transferir pequeñas cantidades de masa bacteriana de un subcultivo incubado entre 16 y 20 horas (p. ej., agar nutritivo o medio de cultivo de Kliger) desde la parte inferior y húmeda del agar inclinado a un portaobjetos y mezclarlas con una gota de reactivo de ensayo Anti-Salmonella H (25 µl aprox.) para obtener una suspensión homogénea, ligeramente lactosa. El portaobjetos debería colocarse sobre una base oscura. Para leer el resultado a simple vista, deberá colocarse el portaobjetos delante de una fuente de luz, contra un fondo negro, y girarse. Para excluir las aglutinaciones espontáneas, deberá realizarse un control negativo con suero fisiológico en lugar de utilizar reactivo de ensayo.
1.2 Si la determinación de antígenos H resulta infructuosa siguiendo el método descrito con anterioridad, inocular la cepa de agar de cobertera para potenciar el desarrollo de antígenos flagelares. Para el agar de cobertera se recomienda el medio de cultivo REF sifin TN 1702 listo para usar. Tras la licuación, añadir 10 ml de este agar de cobertera en una placa de Petri (de 6 cm de diámetro). Después de solidificarse, humedecer la superficie del agar con 100 µl de agua destilada estéril y aplicar la cepa formando un punto en el centro de la placa. Incubar hacia abajo la placa con el estrato de agar entre 35 y 37 ºC hasta el día siguiente. Para la prueba de aglutinación en portaobjetos, extraer el material del borde de la placa.
2. Inducción de fase
En cepas bifásicas en las que solamente se pueda identificar una fase H, para la inducción de la segunda fase debe realizarse el procedimiento de inversión de fase según Sven Gard.
2.1. Mezclar de 0,1 a 0,2 ml de reactivo de ensayo Anti-Salmonella H con 10 ml de agar de cobertera licuado y refrigerado a una temperatura entre 40 y 45 ºC en una placa de Petri de 6 cm de diámetro. Después de que el agar se haya solidificado, humedecer la placa como se indica en 1.2. con agua destilada, inocularla con la cepa de Salmonella, incubarla y realizar la prueba de aglutinación en portaobjetos. Deberá repetirse el procedimiento en caso d que la inducción de fase no dé ningún resultado.
2.2. Como alternativa a este procedimiento clásico, se recomienda el siguiente procedimiento simplificado: Añadir gota a gota de 0,1 a 0,2 ml de reactivo de ensayo Anti-Salmonella H en una placa (de 6 cm de diámetro) con 10 ml de agar de cobertera y distribuirlo por la superficie con una espátula de vidrio estéril. A continuación, inocular el centro de la placa e incubar como se describió con anterioridad. Al cabo de 16-20 horas se puede efectuar la identificación de la segunda fase no inhibida a partir de la cepa derivada. En general, este procedimiento simplificado permite identificar la segunda fase al primer intento.

Valoración de los resultados
Solo podrá realizarse una evaluación de la prueba de aglutinación en portaobjetos si el control negativo permanece turbio y lechoso.
Positivo: Aglutinación visible tras girar la muestra entre 1 y 20 veces. En reacciones positivas fuertes, la aglutinación (copos gruesos o finos) se detecta directamente en el momento en el que se mezcla la masa bacteriana; mientras que en resultados positivos más débiles se detecta tras girar la muestra entre 10 y 20 veces.
Negativo: Si la suspensión permanece turbia y lechosa o se produce una reacción tras haber girado la muestra más de 20 veces, la reacción es negativa.

Control de calidad durante el procedimiento de ensayo
Para el control de calidad de la caracterización serológica mediante la prueba de aglutinación en portaobjetos, es importante que las cepas utilizadas expresen bien sus antígenos en la superficie de la célula. Por eso, para realizar los controles de calidad se recomienda utilizar cepas procedentes de ensayos interlaboratorio, cepas silvestres de origen definido íntegramente caracterizadas en laboratorios externos o bien antígenos aptos O, H de *Salmonella* disponibles en el mercado.

Limitaciones del método
Los agentes reactivos reaccionan solamente con cepas de Salmonella que contienen antígenos de las especificidades declaradas. No se han detectado reacciones cruzadas con cepas de otros géneros de la familia de las *Enterobacteriaceae*. La identificación de los antígenos H se efectúa después de haber identificado el/los antígeno/s O y la clasificación bioquímica al género *Salmonella*.

Explicación de los símbolos utilizados

LOT	Código de lote		Utilizar antes de AAAA-MM (MM = final del mes)
REF	Número de referencia del catálogo		Límite de temperatura
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Consultar las instrucciones de uso
TR	Reactivo de ensayo		Prueba de aglutinación en portaobjetos
mTR	Reactivo de ensayo monoclonal	LYO	liofilizado
PI	Inducción de fase		

Fecha de esta versión: 10/09/2019