sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 927 030-0 | F: +49 30 927 030-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

# Anti-Salmonella H

Testreagenz für die Objektträgeragglutination und Phaseninduktion (PI)

INFORMATION ZUM GEBRAUCH DURCH FACHPERSONAL

CE IVD

de

**Zweckbestimmung**
Die Testreagenzien Anti-Salmonella H dienen der Ermittlung bzw. Überprüfung der H-Antigene von *Salmonella*-Stämmen entsprechend dem White-Kauffmann-Le-Minor-Schema (Kauffmann-White-Schema) mit Hilfe der Objektträgeragglutination. Sie ermöglichen die Bestimmung des Serovars. Die in unten stehender Tabelle gekennzeichneten Testreagenzien können bei bi-phasischen Stämmen auch zur Induktion der nicht nachweisbaren H-Phase (Schwärmhemmverfahren nach Sven Gard) verwendet werden.

**Testprinzip**
Besitzt der *Salmonella*-Stamm ein dem Erfassungsbereich des Testreagenzes entsprechendes H-Antigen, wird dieses beim Mischen mit dem spezifischen Antikörper gebunden. Infolge der Antigen-Antikörper-Reaktion wird der Stamm deutlich sichtbar agglutiniert.

**Zusammensetzung**
Die Testreagenzien sind monoklonale Antikörper, Testseren oder eine Mischung aus monoklonalen Antikörpern und Testserum. Monoklonale Antikörper werden aus Zellkulturüberständen von Hybridomzelllinien hergestellt, die Antikörper gegen die entsprechenden *Salmonella*-H-Antigene sezernieren. Die Testseren sind Seren von immunisierten Kaninchen, die durch Absorption von unspezifischen Agglutininen befreit wurden.
Konservierungsmittel: Natriumazid ($NaN_3$) 0,9 mg/ml

**Verfügbare Spezifitäten Anti-Salmonella**

| Spezif. | Nachgewiesene Antigene | 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 | alle Antigenkombinationen des H:G-Komplexes außer H:m,t | x |
| H:g,m | alle Antigenkombinationen des H:G-Komplexes einschließlich 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] erkennt Hz bei Subspecies I, II und III

**Darreichungsform, Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen**
Testreagenzien, die in der mikrobiologischen Praxis häufig benötigt werden, liegen in flüssiger, gebrauchsfertiger Form vor. Testreagenzien für Spezifitäten mit geringerem Bedarf sind lyophilisiert.
**Flüssige** Testreagenzien sind original verschlossen und nach erstmaligem Öffnen bei Lagerung bei 2...8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum verwendbar. Nach Benutzung sind die Fläschchen wieder gut zu verschließen.
**Lyophilisierte** Testreagenzien sind vor dem Gebrauch in 1 ml bzw. 5 ml Aqua dest. entsprechend der Deklaration zu lösen und mit der beiliegenden Pipette gut zu verschließen. Bei Lagerung bei 2...8 °C sind sie mindestens 18 Monate verwendbar, jedoch maximal bis zu dem auf dem Etikett deklarierten Datum.
Gelegentlich können in den Testreagenzien nicht mikrobiell verursachte Trübungen auftreten. Sie beeinträchtigen nicht die Wirksamkeit der Testreagenzien und können durch Zentrifugation oder Filtration beseitigt werden.
Vor Gebrauch müssen die Testreagenzien auf Raumtemperatur (18...26 °C) temperiert werden.

**Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**
Durch die biotechnologische Herstellung der Testreagenzien ist das Risiko einer Kontamination durch infektiöse Krankheitserreger nahezu ausgeschlossen. Wegen des Gehalts an tierischen Materialien (fötales Kälberserum, Stabilisator) sollten sie als potentiell infektiös gehandhabt werden. Testreagenzien, die biologisches Material in Form von Kaninchenserum enthalten, sollten deshalb als potentiell infektiös angesehen werden und entsprechend gehandhabt werden.
Wegen des Gehalts an Natriumazid Kontakt mit der Haut und Schleimhäuten vermeiden; gegebenenfalls mit reichlich Wasser spülen. Da bei der Durchführung der Objektträgeragglutination mit nativem Erregermaterial gearbeitet wird, müssen die notwendigen Arbeitsschutzmaßnahmen eingehalten werden (Infektionsgefahr).

**Nicht mitgelieferte Arbeitsmaterialien und Ausrüstungen**
Glasobjektträger, Rührstäbchen, physiologische Kochsalzlösung (9,0 g/l NaCl), Abwurfbehälter für infektiöses Material, White-Kauffmann-Le-Minor-Schema, sterile Petrischalen (6 cm Durchmesser), Schwärmagar, Mikrowelle oder Wasserbad, Thermometer.

**Untersuchungsmaterial und Methodik**
**1. Antigenbestimmung**
**1.1** Von einer 16- bis 20-stündigen Subkultur (z. B. Nähragar oder Kligler) wird etwas Bakterienmasse vom unteren, feuchten Teil des Schrägagars auf einem Objektträger in einem Tropfen (ca. 25 µl) Testreagenz Anti-Salmonella H zu einer homogenen, leicht milchigen Suspension eingerieben. Der Objektträger sollte sich auf einer dunklen Unterlage befinden. Der Objektträger wird vor einer Lichtquelle gegen einen schwarzen Hintergrund gehalten, geschwenkt und das Ergebnis mit bloßem Auge abgelesen. Zum Ausschluss von Spontanagglutinationen ist eine Negativkontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung anstelle des Testreagenzes mitzuführen.
**1.2** Gelingt die H-Antigenbestimmung nach der oben beschriebenen Methode nicht, ist der Stamm zur besseren Ausprägung der Geißelantigene auf Schwärmagar zu überimpfen. Für den Schwärmagar empfehlen wir den Fertignährboden sifin REF TN 1702. 10 ml dieses Schwärmagars werden nach Verflüssigung in eine Petrischale (6 cm Durchmesser) gegeben. Nach dem Erstarren wird die Agaroberfläche mit ca. 100 µl sterilem Aqua dest. benetzt und der Stamm punktförmig in der Mitte der Platte aufgetragen. Die Platte wird mit der Agarschicht nach unten bis zum nächsten Tag bei 35...37 °C inkubiert. Zur Objektträgeragglutination wird das Material vom Rand der Platte entnommen.
**2. Phaseninduktion**
Bei diphasischen Stämmen, bei denen nur eine H-Phase nachweisbar ist, muss zur Induktion der zweiten Phase das Schwärm-Hemmverfahren nach Sven Gard durchgeführt werden.
**2.1.** 0,1 bis 0,2 ml Testreagenz Anti-Salmonella H werden mit 10 ml verflüssigtem, auf 40...45 °C abgekühltem Schwärmagar in einer Petrischale von 6 cm Durchmesser gemischt. Nach dem Erstarren des Agars wird die Platte wie unter 1.2. angegeben mit Aqua dest. benetzt, mit dem Salmonella-Stamm beimpft, bebrütet und die Objektträgeragglutination durchgeführt. Gelingt die Phaseninduktion nicht, ist das Hemmverfahren zu wiederholen.
**2.2.** Neben diesem klassischen Verfahren empfehlen wir folgende vereinfachte Vorgehensweise: Auf eine Platte (6 cm Durchmesser) mit 10 ml Schwärmagar werden 0,1 bis 0,2 ml Testreagenz Anti-Salmonella H getropft und mit einem sterilen Glasspachtel auf der Oberfläche verteilt. Danach wird die Mitte der Platte beimpft und wie o.a. bebrütet. Nach 16 bis 20 Stunden kann von dem geschwärmten Stamm die Identifikation der zweiten, nicht gehemmten H-Phase vorgenommen werden. Das vereinfachte Verfahren ermöglicht den Nachweis der zweiten Phase in der Regel beim ersten Versuch.

**Bewertung des Ergebnisses**
Eine Auswertung der Objektträgeragglutination ist nur möglich, wenn die Negativkontrolle milchig trüb bleibt.
**Positiv:** Sichtbare Agglutination nach 1 bis 20 Schwenkungen. Bei stark positiver Reaktion tritt eine Agglutination (grob- oder feinflockig) bereits beim Einreiben der Bakterienmasse auf, bei schwach positivem Ergebnis erst nach 10 bis 20 Schwenkungen.
**Negativ:** Eine milchig-trüb bleibende Suspension oder eine nach mehr als 20 Schwenkungen auftretende Reaktion ist negativ.

**Qualitätssicherung bei der Testdurchführung**
Für die Qualitätskontrolle der serologischen Typisierung mittels Objektträgeragglutination ist es wichtig, dass die dazu verwendeten Stämme ihre Antigene an der Zelloberfläche gut exprimieren. Es empfiehlt sich daher, Stämme aus Ringversuchen, extern vollständig charakterisierte Feldstämme definierter Herkunft oder geeignete kommerziell erhältliche *Salmonella* O, H-Testantigene zur Qualitätskontrolle einzusetzen.

**Grenzen der Methode**
Die Testreagenzien reagieren nur mit *Salmonella*-Stämmen, die Antigene der deklarierten Spezifität enthalten. Kreuzreaktionen mit Stämmen anderer Genera der *Enterobacteriaceae* konnten nicht nachgewiesen werden. Die Bestimmung der H-Antigene erfolgt nach der serologischen Bestimmung des(r) O-Antigens(e) und der biochemischen Zuordnung zum Genus *Salmonella*.

**Erklärung der benutzten Symbole**

LOT Chargennummer (Chargenbezeichnung)
REF Bestellnummer
IVD In-vitro-Diagnostikum
TR Testreagenz
mTR Monoklonales Testreagenz
PI Phaseninduktion
Verwendbar bis JJJJ-MM (MM = Monatsende)
Temperaturbegrenzung
Gebrauchsanweisung beachten
Objektträgeragglutination
LYO lyophilisiert

Datum der Fassung: 21/07/2015



sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 927 030-0 | F: +49 30 927 030-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

# Anti-Salmonella H

Réactif d'essai pour l'agglutination sur lame et l'induction de phase (IP)

INFORMATION À L'USAGE DES PROFESSIONNELS

CE IVD

fr

**Usage prévu**
Les réactifs d'essai Anti-Salmonella H servent à déterminer et vérifier les antigènes H des souches de *Salmonella* conformément au schéma de White-Kauffmann-Le-Minor (schéma de Kauffmann-White) à l'aide de l'agglutination sur lame. Ils permettent de déterminer le sérovar.
Les réactifs d'essai figurant dans le tableau ci-dessous peuvent également être employés dans des souches diphasiques pour l'induction de la phase H non détectable (procédé par essaimage selon Sven Gard).

**Principe de l'essai**
Si la souche de *Salmonella* possède un antigène correspondant à la plage de détection du réactif d'essai, celui-ci se lie à l'anticorps spécifique lors du mélange. En conséquence de la réaction de l'antigène et de l'anticorps, on constate que la souche est nettement agglutinée.

**Composition**
Les réactifs d'essai sont des anticorps monoclonaux, des sérums d'essai ou un mélange d'anticorps monoclonaux et de sérum d'essai. Les anticorps monoclonaux sont préparés à partir de surnageants de culture cellulaire de lignées cellulaires d'hybridomes qui secrètent des anticorps contre les antigènes H de *Salmonella* correspondants. Les sérums d'essai sont des sérums de lapins immunisés qui ont été libérés par absorption d'agglutinines non spécifiques.
Conservateur: azoture de sodium ($NaN_3$) 0,9 mg/ml

**Spécificités disponibles Anti-Salmonella**

| Spécif. | Antigènes détectés | IP |
|---|---|---|
| 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 | toutes les combinaisons d'antigènes du complexe H:G en dehors de H:m,t | x |
| H:g,m | toutes les combinaisons d'antigènes du complexe H:G y compris 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] identifie Hz dans les sous-espèces I, II et III

**Présentation, conservation et conditions de stockage**
Les réactifs d'essai qui sont souvent requis dans les laboratoires de microbiologie se trouvent sous forme liquide, prête à l'emploiii. Les réactifs d'essai pour les spécificités pour lesquelles le besoin est faible sont lyophilisés.
Si les réactifs d'essai **liquides** sont conservés dans leur emballage d'origine et une fois ouverts, conservés à une température de 2...8 °C, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Après utilisation, les flacons doivent être bien refermés.
Les réactifs d'essai **lyophilisés** doivent être dissouts avant emploi dans 1 ml ou 5 ml d'eau distillée conformément à l'indication et bien refermés avec la pipette compte-goutte incluse. S'ils sont stockés à 2...8 °C, ils sont utilisables pendant au moins 18 mois, mais au maximum jusqu'à la date mentionnée sur l'étiquette.
Des turbidités d'origine non microbienne peuvent apparaître occasionnellement dans les réactifs d'essai. Elles n'affectent pas l'efficacité des des réactifs d'essai et peuvent être éliminées par centrifugation ou filtration.
Avant emploi, les réactifs d'essai doivent être amenés à température ambiante (18...26 °C).

**Mises en garde et précautions d'emploi**
En raison de la préparation biotechnologique des réactifs d'essai, le risque d'une contamination par des agents pathogènes infectieux est pratiquement exclu. En raison de la teneur en matériaux d'origine animale (sérum de veau fœtal, stabilisateur), ils devraient être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
Les réactifs d'essai qui contiennent un matériau biologique sous forme de sérum de lapin doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés en conséquence.
A cause de la teneur en azoture de sodium, il faut éviter le contact avec la peau et les muqueuses et le cas échéant, rincer abondamment à l'eau.
Puisque l'on travaille avec des matériaux pathogènes natifs lors de la réalisation de l'agglutination sur lame, il faut respecter les mesures de sécurité au travail (risque d'infection).

**Matériaux de travail et équipements non fournis**
lame de verre, agitateur, solution physiologique de sel de cuisine (9,0 g/l NaCl), collecteur de déchets pour les matériaux infectieux, schéma de White-Kaufmann-Le Minor, boîtes de Petri stériles (6 cm de diamètre), gélose d'essaimage, micro-ondes ou bain-marie, thermomètre.

**Matériau d'essai et méthodologie**
**1. Détermination des antigènes**
**1.1** On enduit un peu de substance bactérienne de la partie humide, inférieure de la gélose inclinée issue d'une sous-culture de 16 à 20 heures (par ex. gélose nutritive ou milieu de Kligler) sur une lame dans une goutte (environ 25 µl) de réactif d'essai Anti-Salmonella H de manière à obtenir une suspension homogène, légèrement laiteuse. La lame devrait se trouver sur une base sombre.
On maintient la lame devant une source de lumière, contre un fond noir, on la fait tourner et on lit le résultat à l'œil nu. Pour exclure des agglutinations spontanées, il faut réaliser un témoin négatif avec une solution physiologique de sel de cuisine au lieu du réactif d'essai.
**1.2** Si la détermination de l'antigène H n'est pas obtenue suivant la méthode décrite ci-dessus, la souche doit être ensemencée sur une gélose d'essaimage pour une meilleure imprégnation des antigènes de flagelle. En gélose d'essaimage, nous recommandons le milieu nutritif prêt à l'emploi sifin REF TN 1702.
On verse 10 ml de cette gélose d'essaimage après liquéfaction dans une boîte de Petri (6 cm de diamètre). Une fois solidifiée, cette surface de gélose est mouillée avec environ 100 µl d'eau distillée stérile et la souche est appliquée en forme de point au centre de la plaque. On laisse incuber la plaque avec la couche de gélose vers le bas jusqu'au lendemain à 35...37 °C. Le matériau est enlevé du bord de la plaque pour l'agglutination sur lame.
**2. Induction de phase**
Pour les souches diphasiques dans lesquelles seule une phase H est détectable, le procédé par essaimage selon Sven Gard doit être réalisé pour l'induction de la seconde phase.
**2.1.** On mélange 0,1 à 0,2 ml de réactif d'essai Anti-Salmonella H avec 10 ml de gélose d'essaimage liquéfiée, refroidie à 40...45 °C dans une boîte de Petri de 6 cm de diamètre. Après la solidification de la gélose, on mouille la plaque avec de l'eau distillée comme indiqué en 1.2, on l'ensemence avec la souche de Salmonella, on la laisse incuber et on effectue l'agglutination sur lame. Si l'induction de phase ne réussit pas, il faut répéter le procédé de Sven Gard.
**2.2.** Outre ce procédé classique, nous recommandons la procédure simplifiée suivante : On verse goutte à goutte 0,1 à 0,2 ml de réactif d'essai Anti-Salmonella H sur une plaque (de 6 cm de diamètre) avec 10 ml de gélose d'essaimage et on les répartit sur la surface à l'aide d'une spatule en verre stérile. Ensuite, on ensemence le centre de la plaque et on laisse incuber comme décrit ci-dessus. Au bout de 16 à 20 heures, on peut effectuer l'identification de la seconde phase H non inhibée à partir de la souche essaimée. Le procédé simplifié permet en règle générale de détecter la seconde phase à la première tentative.

**Evaluation du résultat**
Une évaluation de l'agglutination sur lame n'est possible que si le témoin négatif reste trouble et laiteux.
**Positif:** agglutination visible au bout de 1 à 20 rotations. En cas de réaction fortement positive, on constate une agglutination (de flocons grossiers ou fins) dès la substance bactérienne enduite, en cas de résultat faiblement positif, uniquement au bout de 10 à 20 rotations.
**Négatif:** une suspension trouble et laiteuse ou une réaction qui survient au bout de plus de 20 rotations est négative.

**Assurance qualité lors de la réalisation du test**
Pour le contrôle qualité du typage sérologique à l'aide de l'agglutination sur lame, il est important que les souches utilisées expriment bien leurs antigènes à la surface de la cellule. Pour effectuer le contrôle qualité, il est donc recommandé d'utiliser des souches issues de séries de tests interlaboratoires, des souches sauvages d'origine définie entièrement caractérisées en interne ou l'antigène test H, *Salmonella* O disponible dans le commerce.

**Limites de la méthode**
Les réactifs d'essai réagissent seulement avec des souches de *Salmonella* qui contiennent des antigènes de la spécificité déclarée. Des réactions croisées avec des souches d'autres genres d''Enterobacteriaceae n'ont pu être détectées. La détermination des antigènes H est réalisée après la détermination sérologique de(s) l'antigène(s) O et de la classification biochimique dans le genre *Salmonella*.

**Explication des symboles utilisés**

LOT Code du lot
REF Référence du catalogue
IVD Dispositif medical de diagnostic in vitro
TR Réactif d'essai
mTR Réactif d'essai monoclonal
PI l'induction de phase
Utiliser jusque AAAA-MM (MM = fin du mois)
Limites de température
Consulter les instructions d'utilisation
l'agglutination sur lame
LYO lyophilisé

Date de la présente version: 21/07/2015



sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 927 030-0 | F: +49 30 927 030-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

# Anti-Salmonella H

Test reagent for slide agglutination and phase reversal (PR)

INFORMATION FOR PROFESSIONAL USE

CE IVD

en

**Intended use**
The Anti-Salmonella H test reagents are intended for use in identifying or checking the H-antigens of *Salmonella* strains in accordance with the White-Kauffmann-Le-Minor scheme (Kauffmann-White scheme) using slide agglutination. They enable the serovar to be determined.
The test reagents indicated in the table below may also be used in the case of diphasic strains for induction of the unidentified H-phase (phase inversion by culture on swarm agar/ Sven Gard method).

**Principle of the test**
If the *Salmonella* strain contains an H-antigen that is covered by the test reagent, this antigen becomes bound when mixed with the specific antibody. The antigen-antibody reaction results in clearly visible agglutination of the strain.

**Composition**
The test reagents are monoclonal antibodies, test sera or a mixture of monoclonal antibodies and test serum. Monoclonal antibodies are produced from cell culture supernatants of hybridoma cell lines which secrete antibodies against the respective Salmonella H antigens. The test sera are immunized rabbit sera from which unspecific agglutinins have been removed by absorption.
Preservative: Sodium azide ($NaN_3$) 0.9 mg/ml

**Available specificities Anti-Salmonella**

| Specif. | Antigens identified | 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 | All antigen combinations of H:G complexes, except H:m,t | x |
| H:g,m | All antigen combinations of H:G complexes, incl. 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] identifies Hz in Subspecies I, II und III

**Form in which product is supplied, shelf life and conditions for storage**
Test reagents that are frequently needed in the microbiological laboratory are available in liquid form ready to use. Test reagents for specificities that are needed less often are lyophilized (freeze-dried).
If stored at 2...8 °C both before and after opening, **liquid** test reagents may be used up to the date given on the label and must be properly resealed after use. The lyophilized test reagents must be dissolved in 1 ml or 5ml distilled water in accordance with the declaration before use. They can be properly closed with the enclosed pipette. If stored at 2...8 °C, they remain usable for at least 18 months. However, they must not be used after the date given on the label.
The test reagent may sometimes show turbidity not caused by microbes. Such turbidity does not impair effectivity and the test sera/ test reagents can be clarified by centrifugation or filtration.
Prior to use, the test reagents must be warmed up to room temperature (18...26 °C).

**Warnings and precautions**
The biotechnological manufacture of the test reagents means that the risk of contamination by infectious agents can be virtually excluded. Because they contain animal materials (fetal calf serum, stabilizer), they should be treated as potentially infectious and handled accordingly. Test reagents containing biological material in the form of rabbit serum should therefore be treated as potentially infectious and handled accordingly.
As these materials contain sodium azide, contact with the skin and mucous membranes must be avoided. In case of contact, rinse with plenty of water. Since the performance of the slide agglutination test involves working with native pathogenic materials, all necessary work protection procedures must be adhered to (risk of infection)!

**Materials and equipment not supplied**
Glass slides, stirring rods, physiological saline (NaCl 9 g/l), disposal containers for infectious material, Kauffmann-White-Le-Minor scheme, sterile petri dishes (6 cm diameter), swarm agar, microwave oven or water-bath, thermometer.

**Test material and methodology**
**1. Determination of the antigen**
**1.1** Take a small amount of bacterial mass from a 16-20 hour old subculture (e.g. nutrient agar or Kligler culture medium), picked from the lower, moister layer of the agar slope. Transfer onto a slide and mix well with a drop (ca. 25 µl) of Anti-Salmonella H test reagent, so that a homogenous, slightly milky suspension results. The slide should be placed on a dark surface.
The reaction is read with the naked eye by holding the slide in front of a light source against a black background and rocking it (tilting it back and forth). To control for spontaneous agglutination, a negative control must be performed at the same time using physiological saline in place of the test reagent.
**1.2** In case the H-antigen test performed according to the method described above is not successful, the strain must be inoculated onto swarm agar, to enhance the development of the flagella antigens. For the swarm agar we recommend our ready-to-use culture medium sifin REF TN 1702. After liquefaction, place 10 ml of this swarm agar into a petri dish (6 cm diameter). Once it has solidified, sprinkle the surface of the agar with ca. 100 µl sterile distilled water and apply the strain in the form of a point in the centre of the plate. Incubate the dish overnight with the agar layer facing down at 35...37 °C. For the slide agglutination test, collect material from the edge of the dish.
**2. Phase reversal**
If the strain is diphasic but only one H phase can be identified, the phase inversion procedure (Sven Gard method) must be performed to induce the second phase.
**2.1.** Mix 0.1-0.2 ml Anti-Salmonella H test reagent with 10 ml liquefied swarm agar (cooled to 40...45 °C) in a 6 cm diameter petri dish. After the agar has solidified, sprinkle the plate with distilled water (as described under 1.2.), inoculate it with the Salmonella strain, incubate it and perform the slide agglutination test. If the phase inversion is unsuccessful, the procedure should be repeated.
**2.2.** As an alternative to this classical procedure, we recommend the following simplified procedure. Add 0.1-0.2 ml Anti-Salmonella H test reagent drop by drop to a plate (6 cm diameter) containing 10 ml swarm agar, and spread over the surface with a sterile glass spatula. Then inoculate the middle of the plate and incubate as indicated above. After 16-20 hours, the strain which swarms can be used to identify the second H phase. This simplified procedure usually enables the second phase to be identified at the first attempt.

**Evaluation**
The test can only be evaluated if the negative control remains milky-opaque.
**Positive:** visible agglutination after the sample has been tilted back and forth less than 20 times. In a strongly positive reaction, agglutination (coarsely or finely flocculent) appears as soon as the bacterial mass is mixed in. In a weakly positive result, agglutination only appears after the slide has been tilted back and forth 10-20 times.
**Negative:** if the suspension remains milky-opaque or the reaction begins to occur only after the slide has been tilted back and forth more than 20 times, the result is negative.

**Quality assurance during the testing procedure**
For quality control of the serotyping using slide agglutination, it is important that the strains used for this purpose express their antigens well on the cell surface. It is therefore recommended to use strains from interlaboratory tests, field strains of defined origin that have been fully characterised in an external laboratory or suitable commercial *Salmonella* O- and H-antigens.

**Limitations of the method**
The test reagents react solely with *Salmonella* strains which contain antigens of the specificity named in the declaration. Cross-reactions with strains of other genera of *Enterobacteriaceae* have not been found. The identification of the H-antigens is achieved by the serological identification of the O-antigen(s) and the biochemical allocation to the *Salmonella* genus.

**Explanation of the symbols used**

LOT Batch code (Lot)
REF Catalogue number
IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
TR Test reagent
mTR Monoclonal test reagent
PI Phase reversal
Use by YYYY-MM (MM = end of month)
Temperature limitation
Consult instructions for use
Slide agglutination
LYO lyophilized

Date of revision: 21/07/2015

sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 927 030-0 | F: +49 30 927 030-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

# Anti-Salmonella H

Reagente di prova per agglutinazione su vetrino e inversione di fase (PR)

INFORMAZIONI PER L'USO PROFESSIONALE

CE IVD

it

## Uso previsto
I reagenti di prova Anti-Salmonella H sono stati concepiti per essere utilizzati per identificare o verificare gli antigeni H di ceppi di *Salmonella* conformemente allo schema di White-Kauffmann-Le-Minor (schema di Kauffmann-White) mediante agglutinazione su vetrino. Essi consentono di determinare il sierotipo.
I reagenti di prova indicati nella tabella sottostante possono essere utilizzati anche in caso di ceppi bifasici per l'induzione della fase H non identificata (inversione di fase per coltura su agar di sciamatura/metodo Sven Gard).

## Principio del test
Se il ceppo di *Salmonella* contiene un antigene H incluso nel campo d'azione del reagente di prova, questo antigene si lega con l'anticorpo specifico all'atto della miscelazione. La reazione antigene-anticorpo dà luogo all'agglutinazione chiaramente visibile del ceppo.

## Composizione
I reagenti di prova sono anticorpi monoclonali, sieri di prova o una miscela di anticorpi monoclonali e siero di prova.
Gli anticorpi monoclonali vengono prodotti da surnatanti di colture cellulari di linee cellulari di ibridomi che secernono anticorpi contro i rispettivi antigeni H di *Salmonella*. I sieri di prova sono sieri di conigli immunizzati dai quali sono state asportate mediante assorbimento agglutinine aspecifiche.
Conservante: azoturo di sodio ($NaN_3$) 0,9 mg/ml

## Specificità Anti-Salmonella disponibili

| Specif. | Antigeni identificati | 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 | Tutte le combinazioni di antigeni dei complessi H:G, eccetto H:m,t | x |
| H:g,m | Tutte le combinazioni di antigeni dei complessi H:G, incl. 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 Hz nelle sotto-specie I, II e III

## Forma in cui il prodotto è fornito, periodo di validità e condizioni di conservazione
I reagenti di prova spesso necessari nei laboratori microbiologici sono disponibili in forma liquida e pronti all'uso. I reagenti di prova per le specificità necessari con minore frequenza sono liofilizzati (crioessiccati).
Se conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C sia prima che dopo l'apertura, i reagenti di prova **liquidi** possono essere utilizzati fino alla data indicata sull'etichetta. I reagenti sono pronti all'uso. Dopo l'uso, il flacone deve essere opportunamente richiuso.
Prima dell'uso, i reagenti di prova **liofilizzati** devono essere sciolti in 1 ml o 5 ml di acqua distillata secondo quanto dichiarato. Essi possono poi essere opportunamente richiusi con la pipetta in dotazione. Se conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C, sono utilizzabili per almeno 18 mesi. In ogni caso essi non devono essere utilizzati dopo la data indicata sull'etichetta.
Talvolta i reagentidi prova possono presentare una torbidità non di origine microbica. Tale torbidità non ne compromette l'efficacia e i reagenti di prova possono essere chiarificati mediante centrifugazione o filtrazione.
Prima dell'uso i reagenti di prova vanno portati a temperatura ambiente (18...26 °C).

## Avvertenze e precauzioni
Data la produzione biotecnologica dei reagenti di prova, si può virtualmente escludere il rischio di contaminazione da agenti infetti. Poiché contengono materiale di origine animale (siero fetale di vitello, stabilizzatore), vanno trattati come potenzialmente infetti e dunque devono essere maneggiati di conseguenza. I reagenti di prova che contengono materiale biologico sotto forma di siero di coniglio dovebbero essere trattati come potenzialmente infetti e dunque devono essere maneggiati di conseguenza.
Dato che questi materiali contengono azoturo di sodio, occorre evitare il contatto con la cute e con le membrane mucose. In caso di contatto, sciacquare con abbondante acqua. Poiché l'esecuzione del test di agglutinazione su vetrino implica l'uso di materiali patogeni naturali, occorre adottare tutte le necessarie procedure di protezione durante il test (rischio d'infezione)!

## Materiali e attrezzatura non in dotazione
Vetrini, bacchette per agitazione, soluzione salina fisiologica (NaCl 9 g/l), contenitori per lo smaltimento di materiale infetto, schema di White-Kauffmann-Le-Minor, piastre di Petri sterili (diametro 6 cm), agar di sciamatura, forno a microonde o bagnomaria, termometro.

## Materiale di prova e metodologia
### 1. Determinazione dell'antigene
**1.1** Prelevare una piccola quantità di massa batterica da una sottocoltura di 16-20 ore (ad es. agar nutriente o mezzo di coltura in Kligler) dallo strato inferiore e più umido dell'agar inclinato. Trasferirla su vetrino e miscelarla accuratamente con una goccia (circa 25 µl) di reagenti di prova Anti-Salmonella H, in modo tale da ottenere una sospensione omogenea e lievemente lattiginosa Il vetrino deve essere collocato su una superficie scura.
La reazione viene letta a occhio nudo tenendo il vetrino davanti a una fonte luminosa su uno sfondo nero e facendolo oscillare (inclinandolo in avanti e all'indietro). Per verificare ed escludere eventuali agglutinazioni spontanee, è necessario eseguire in contemporanea un controllo negativo utilizzando la soluzione salina fisiologica al posto del reagente di prova.
**1.2** Se il test dell'antigene H eseguito in base al metodo sopra descritto è infruttuoso, inoculare il ceppo in agar di sciamatura, per potenziare lo sviluppo degli antigeni flagellari. Per l'agar di sciamatura raccomandiamo il nostro mezzo di coltura pronto all'uso sifin REF TN 1702. Dopo la liquefazione, mettere 10 ml di quest'agar di sciamatura in una piastra di Petri (diametro 6 cm). Una volta che si è solidificato, spruzzare sulla superficie dell'agar circa 100 µl di acqua distillata sterile e applicare il ceppo formando un punto al centro della piastra. Incubare la piastra per una notte a 35...37 °C con lo strato di agar rivolto verso il basso. Per il test di agglutinazione su vetrino, prelevare del materiale dal bordo della piastra.
### 2. Inversione di fase
Se il ceppo è bifasico ma è identificabile solo una fase H, è necessario eseguire la procedura d'inversione di fase (metodo Sven Gard) per indurre la seconda fase.
**2.1.** Mescolare 0.1-0.2 ml di reagente di prova per test Anti-Salmonella H con 10 ml di agar di sciamatura liquefatto (raffreddato a 40...45 °C) in una piastra di Petri dal diametro di 6 cm. Dopo che l'agar si è solidificato, spruzzare acqua distillata sulla piastra (come descritto al punto 1.2), inoculare il ceppo di Salmonella, incubare ed eseguire il test di agglutinazione su vetrino. Se l'inversione di fase non dà alcun risultato, occorre ripetere la procedura.
**2.2.** In alternativa a questa procedura classica, raccomandiamo la seguente procedura semplificata. Aggiungere goccia a goccia 0,1-0,2 ml di reagente di prova Anti-Salmonella H in una piastra (diametro 6 cm) contenente 10 ml di agar di sciamatura, e cospargerli sulla superficie con una spatola in vetro sterile. Quindi eseguire l'inoculazione al centro della piastra e incubare come sopra descritto. Dopo 16-20 ore, il ceppo che sciama può essere utilizzato per identificare la seconda fase H. Solitamente questa procedura semplificata permette di identificare la seconda fase al primo tentativo.

## Valutazione
Il test può essere valutato solo se il controllo negativo resta lattiginoso opaco.
**Risultato positivo:** agglutinazione visibile dopo che il campione è stato inclinato in avanti e all'indietro meno di 20 volte. In caso di reazione fortemente positiva, l'agglutinazione (di aspetto fioccoso grossolano o fine) compare appena viene inserita e miscelata la massa batterica. In caso di risultato debolmente positivo, l'agglutinazione appare solo dopo che il vetrino è stato inclinato in avanti e all'indietro da 10 a 20 volte.
**Risultato negativo:** se la sospensione resta lattiginosa opaca o la reazione inizia solo dopo che il vetrino è stato inclinato in avanti e all'indietro per più di 20 volte, il risultato è negativo.

## Garanzia di qualità nell'esecuzione delle prove
Ai fini del controllo della qualità della tipizzazione sierologica mediante agglutinazione su vetrino, è importante che i ceppi utilizzati esprimano bene i propri antigeni sulla superficie cellulare. Pertanto si consiglia di utilizzare per il controllo di qualità ceppi provenienti da Round Robin Test (prove interlaboratorio), ceppi di campo completamente caratterizzati esternamente di origine definita, oppure antigeni O, H di prova della *Salmonella* idonei e disponibili in commercio.

## Limitazioni del metodo
I reagenti di prova reagiscono solo con i ceppi di *Salmonella* che contengono antigeni aventi la specificità dichiarata. Non sono state rilevate reazioni crociate con ceppi di altri generi della *Enterobacteriaceae*. L'antigene H viene definito in base alla definizione sierologica del/degli antigene/i O e all'assegnazione biochimica del gene *Salmonella*.

## Spiegazione dei simboli utilizzati

| | |
|---|---|
| LOT | Codice del lotto |
| REF | Numero catalogo |
| IVD | Dispositivo medico-diagnostico in vitro |
| TR | Reagente di prova |
| mTR | Reagente di prova monoclonale |
| PI | Inversione di fase |
| | Utilizzare entro il AAAA-MM (MM = fine del mese) |
| | Limite di temperatura |
| | Rispettare le istruzioni per l'uso |
| | Agglutinazione su vetrino |
| LYO | Liofilizzato |

Data di revisione: 21/07/2015



sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 927 030-0 | F: +49 30 927 030-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

# Anti-Salmonella H

Tesztreagens tárgylemez-agglutinációhoz és fázisváltáshoz (PR)

PROFESSZIONÁLIS ALKALMAZÁSI UTASÍTÁS

CE IVD

hu

## Felhasználás
Az Anti-Salmonella H tesztreagensek a *Salmonella* törzsek H antigénjeinek White-Kauffmann-Le-Minor séma (Kauffmann-White séma) szerinti azonosítására vagy ellenőrzésére alkalmasak tárgylemez-agglutinációs módszerrel. Lehetővé teszik a szerovariáns meghatározását.
Az alábbi táblázatban felsorolt tesztreagensek és tesztszérumok difázisos törzsek esetén a nem azonosított H fázis indukciójára is használhatók (fázisinverzió rajzást támogató (swarm) agaron történő tenyésztéssel/ Sven Gard módszer).

## A próba elve
Ha a *Salmonella* törzs rendelkezik a tesztreagensnek megfelelő H antigénnel, ez az antigén a specifikus antitesttel keverve megkötődik. Az antigén-antitest reakció eredménye a törzs jól látható agglutinációja.

## Összetétel
A tesztreagensek monoklonális antitestek, tesztszérumok vagy monoklonális antitestek és tesztszérum keveréke. Az antitesteket a megfelelő *Salmonella* H antigénekkel szemben antitesteket kiválasztó hibridóma sejtvonaltenyészetek szupernatánsából állítják elő. A tesztszérumok immunizált nyúlszérumok, amelyekből a nem specifikus agglutinineket kimerítéssel eltávolították.
Tartósítószer: nátrium-azid ($NaN_3$), 0,9 mg/ml.

## Rendelkezésre álló Anti-salmonella specificitások

| Specif. | Azonosított antigének | 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 | A H:G komplexek minden antigén kombinációja, kiv. H:m,t | x |
| H:g,m | A H:G komplexek minden antigen kombinációja, a H:m,t is | |
| 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] a Hz azonosítására az I, II és III subspeciesekben

## A termék kiszerelési formája, eltarthatósága és tárolási feltételei
Azok a tesztreagensek, amelyekre gyakran van szükség a mikrobiológiai laboratóriumokban, folyékony formában kaphatók. Azon specificitások tesztreagensei, amelyekre ritkábban van szükség, liofilizált (fagyasztással szárított) formában kaphatók.
Felbontatlanul vagy felbontás után 2-8 °C-on tárolva a **folyékony** tesztreagensek a címkén megadott dátumig használhatók fel. A reagensek használatra készek. Használat után a palackot megfelelően le kell zárni.
A **liofilizált** tesztreagenseket használat előtt az utasításnak megfelelően 1 ml vagy 5 ml desztillált vízben kell feloldani. A feloldott liofilizátumokat a mellékelt pipettával megfelelően le lehet zárni. 2-8 °C-on tárolva legalább 18 hónapig felhasználhatók. A címkén feltüntetett időponton túl azonban nem használhatók fel.
A tesztreagensekben esetenként nem mikrobiális eredetű zavarosság mutatkozhat. Ez a zavarosság nem rontja a tesztreagens hatékonyságát, és centrifugálással vagy szűréssel megszüntethető. Használat előtt a tesztreagenst szobahőmérsékletre (18...26 °C) kell temperálni.

## Figyelmeztetések és óvintézkedések
A tesztreagensek biotechnológiai gyártási eljárásának köszönhetően a fertőző ágensekkel történő szennyeződés kockázata gyakorlatilag kizárható. Mivel a készítmények állati eredetű anyagot tartalmaznak (magzati borjúszérumot, stabilizátort), potenciálisan fertőző anyagnak tekintendők, és ennek megfelelően kezelendők. A tesztreagensek, amelyek biológiai eredetű anyagot (nyúlszérum) tartalmaznak, potenciálisan fertőző anyagnak tekintendők, és ennek megfelelően kezelendők.
Tekintve, hogy a készítmények nátrium-azidot tartalmaznak, a bőrrel és nyálkahártyával való érintkezést kerülni kell. Ha mégis a bőrre vagy nyálkahártyára kerülnek, bő vízzel kell lemosni. Mivel a tárgylemez-agglutinációs próba élő kórokozóval végzett tevékenységet is tartalmaz, minden szükséges munkavédelmi eljárást be kell tartani (fertőzésveszély)!

## Nem szállított anyagok és eszközök
Üveg tárgylemez, keverőpálca, fiziológiás sóoldat (NaCl 9 g/l), fertőző anyag kezelésére szolgáló tárolóedény, White-Kauffmann-Le-Minor séma, steril petricsésze (6 cm átmérőjű), rajzást támogató (swarm) agar, mikrohullámú sütő vagy vízfürdő, hőmérő.

## Vizsgálati anyagok és módszerek
### 1. Az antigén meghatározása
**1.1** Vegyünk ki kis mennyiségű baktériumtömeget 16-20 órás szubkultúrából (pl. nutrient agar vagy Kligler táptalaj), a ferde agar alsó, nedvesebb rétegéből. Vigyük át tárgylemezre, és jól keverjük össze egy csepp Anti-Salmonella H tesztreagenssel (kb. 25 µl) úgy, hogy homogén, kissé tejszerű szuszpenziót kapjunk. A lemezt sötét felületre kell helyezni. Az eredmény leolvasása szabad szemmel történik úgy, hogy a tárgylemezt fekete háttérben fény felé tartjuk, és előre-hátra döntve mozgatjuk. A spontán agglutináció kizárására egyidejűleg negatív kontroll vizsgálatot is kell végezni tesztreagens helyett fiziológiás sóoldattal.
**1.2** Amennyiben a fentiekben leírt módszerrel elvégzett H-antigén vizsgálat nem sikeres, a törzset rajzást támogató (swarm) agarra kell oltani, a csilló antigének fejlődésének elősegítése érdekében. A rajzást támogató (swarm) agarhoz a sifin késztáptalaját ajánljuk, REF TN 1702. Felolvasztás után helyezzünk 10 ml-t ebből a swarm agarból egy petricsészébe (6 cm átmérőjű). Ha az agar megszilárdult, permetezzük be a felületét kb. 100 µl steril desztillált vízzel, és vigyük fel a törzset pont formájában a lemez közepére. Az agarréteget lefelé fordítva, egy éjszakán át 35-37 °C-on inkubáljuk a petricsészét. A tárgylemez-agglutinációs próbához a csésze széléről gyűjtsünk anyagot.
### 2. Fázisváltás
Ha a törzs difázisos, de csak egy H-fázis azonosítható, a fázisinverziós eljárást (Sven Gard módszer) kell elvégezni a második fázis indukálásához.
**2.1.** Keverjünk össze 0,1-0,2 ml Anti-Salmonella H tesztreagenst 10 ml folyékony, rajzást támogató (swarm) agarral (40-45 °C-ra lehűtve) egy 6 cm átmérőjű petricsészében. Miután az agar megszilárdult, permetezzük le a lemezt desztillált vízzel (az 1.2 alatt leírt módon), oltsuk be a Salmonella törzzsel, inkubáljuk, és végezzük el a tárgylemez-agglutinációs próbát. Ha a fázisinverzió sikertelen, az eljárást meg kell ismételni.
**2.2.** E klasszikus eljárás alternatívájaként a következő, egyszerűsített eljárást javasoljuk. Adjunk 0,1 ml Anti-Salmonella H 0,1-0,2 ml tesztreagenst cseppenként egy lemezhez (6 cm átmérőjű), amely 10 ml swarm agart tartalmaz, és terítsük el a felszínén steril üvegspatulával. Ezután oltsuk be a lemez közepét, és a fentiekben leírt módon inkubáljuk. 16-20 óra után a kirajzó törzs használható a második H fázis azonosítására. Az egyszerűsített eljárással általában első próbálkozásra azonosítani lehet a második fázist.

## Kiértékelés
A próba csak akkor értékelhető, ha a negatív kontroll tejszerűen áttetsző marad.
**Pozitív:** szemmel látható agglutináció, ha a mintát kevesebb, mint 20 alkalommal előre-hátra billentjük. Kifejezett pozitív reakció esetén az agglutináció (durva vagy finom pelyhesedés) azonnal megjelenik, amikor a baktériumtömeget be-keverjük. Gyenge pozitív reakció esetén az agglutináció csak akkor jelentkezik, ha a tárgylemezt 10- 20-szor előre-hátra billentjük.
**Negatív:** ha a szuszpenzió tejszerűen áttetsző marad, vagy a reakció csak azután kezd fellépni, ha már több mint 20 alkalommal előre-hátra billentettük a tárgylemezt, az eredmény negatív.

## Minőségbiztosítás a teszt elvégzésekor
A szerológiai tipizálás tárgylemezes agglutináció útján történő minőségellenőrzéséhez fontos, hogy az ehhez alkalmazott törzsek antigénjei a sejtfelületen jól expresszálódjanak. Ezért ajánlott körvizsgálatokból származó törzseket, extern teljesen jellemzett, meghatározott eredetű környezeti törzseket vagy a kereskedelemben kapható megfelelő *Salmonella* O H-tesztantigéneket alkalmazni a minőségellenőrzéshez.

## A módszer korlátai
A tesztreagensek csak olyan *Salmonella* törzsekkel lépnek reakcióba, amelyek a nyilatkozatban megnevezett specificitású antigéneket tartalmazzák.
Az Enterobacteriaceae más nemzetségeinek törzseivel keresztreakciót nem mutattak ki. A H-antigének meghatározása az O-antigén(ek) szerológiai meghatározása és a *Salmonella* nemzetséghez való biokémiai hozzárendelés alapján történik.

## Az alkalmazott jelek magyarázata

| | |
|---|---|
| LOT | Sarzsszám |
| REF | Rendelési szám |
| IVD | In vitro diagnosztikum |
| TR | Tesztreagensek |
| mTR | Monoklonális tesztreagens |
| PI | Fázisváltáshoz |
| | Felhasználható -ig éééé-hh (hh = hónap vége) |
| | Hőmérséklettartomány |
| | Tartsa be a Használati utasítást |
| | Tárgylemez-agglutinációhoz |
| LYO | Liofilizált |

A verzió dátuma: 21/07/2015



sifin diagnostics gmbh | Berliner Allee 317-321 | 13088 Berlin | Germany | T: +49 30 927 030-0 | F: +49 30 927 030-30 | info@sifin.de | www.sifin.de

# Anti-Salmonella H

Тест-реагент для реакции агглютинации на предметном стекле и фазовой индукции (ФИ)

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

CE IVD

ru

## Назначение
Тест-реагенты Anti-Salmonella H предназначены для идентификации или проверки наличия H-антигенов штаммов *Salmonella* методом агглютинации на предметном стекле в соответствии со схемой Кауфмана-Уайта-Ле-Минора (Кауфмана-Уайта). Их использование позволяет установить серовар. Перечисленные в таблице ниже тест-реагенты также можно применять при исследовании двухфазных штаммов для индукции одной из H-фаз (фазовая индукция путем культивирования в агаре роения / методом Свена Гарда).

## Принципы исследования
При наличии у штамма *Salmonella* H-антигена, способного вступать в реакцию с тест-реагентом, происходит связывание этого антигена со специфическим антителом при их смешивании. В результате реакции антиген-антитело наблюдается четко видимая агглютинация микроорганизмов.

## Состав
Тест-реагенты представляют собой моноклональные антитела, тест-сыворотки либо смесь моноклональных антител и тест-сывороток. Моноклональные антитела получены из супернатантов культур гибридных клеточных линий, секретирующих антитела против соответствующих H-антигенов *Salmonella*. Тест-сыворотка представляет собой сыворотку иммунизированных кроликов, которая была очищена от неспецифических агглютининов путем абсорбции. Консервант: натрия азид ($NaN_3$) 0,9 мг/мл

## Предлагаемые варианты специфичности реагентов Anti-Salmonella

| Спец. | Идентифицируемые антигены | ФИ |
|---|---|---|
| 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 | Все комбинации антиг. комплекса H:G, кроме H:m,t | x |
| H:g,m | Все комбинации антиг. комплекса H:G, включая 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] Выявляет антиген Hz у сальмонелл подвидов I, II и III

**Форма выпуска, срок годности и условия хранения:** Тест-реагенты, которые часто используются в микробиологической лаборатории, выпускаются в жидкой форме и готовы к применению. Тест-реагенты для специфических применений, которые требуются реже, выпускаются в лиофилизированной форме. При хранении при температуре 2...8 °C до и после вскрытия **жидкие** тест-реагенты можно использовать до даты, указанной на этикетке. Тест-реагенты готовы к использованию. После применения следует надлежащим образом закрывать флакон. **Лиофилизированные** тест-реагенты перед использованием необходимо растворить в 1 или 5 мл дистиллированной воды в соответствии с указаниями, и надлежащим образом закрыть входящей в комплект пипеткой. В случае хранения при температуре 2...8 °C они остаются пригодными к применению в течение не менее 18 месяцев. Однако не следует использовать их после даты, указанной на этикетке. Иногда в тест-реагентах можно обнаружить помутнение, не связанное с микробным загрязнением. Помутнение не влияет на эффективность и для отделения от примесей тест-реагенты можно центрифугировать или отфильтровать. Перед применением тест-реагенты следует привести к комнатной температуре (18...26 °C).

**Предупреждения и меры предосторожности:** Производство тест-реагентов при помощи биотехнологий фактически исключает риск контаминации возбудителями инфекционных заболеваний. В связи с содержанием материалов животного происхождения (сыворотка эмбрионов коров, стабилизатор), с ними следует обращаться надлежащим образом как с потенциально инфекционным материалом. Тест-реагенты, содержащие биологический материал в виде сыворотки кроликов, являются потенциально инфекционным материалом, и с ними следует обращаться соответствующим образом. В связи с содержанием азида натрия следует избегать контакта этих реагентов с кожей и слизистыми оболочками. В случае контакта промойте пораженные области большим количеством воды. Так как проведение реакции агглютинации на предметном стекле сопряжено с использованием нативного патогенного материала, следует соблюдать все необходимые правила техники безопасности на рабочем месте (риск инфицирования)!

**Материалы и оборудование, не входящие в комплект поставки:** Предметные стекла, палочки для перемешивания, физиологический раствор (NaCl 9 г/л), контейнеры для сбора отходов для инфекционного материала, схема Кауфмана-Уайта-ЛеМинора, стерильные чашки Петри (диаметром 6 см), агар роения, микроволновая печь или водяная баня, термометр.

## Исследуемый материал и методика
### 1. Определение антигена
**1.1** Отберите небольшое количество бактериальной массы из 16—20-часовой субкультуры (рост на питательном агаре, питательной среде Клиглера или др.) из нижней, наиболее влажной части скошенного агара. Перенесите ее на предметное стекло и тщательно перемешайте с каплей (около 25 мкл) тест-реагента Anti-Salmonella H до образования гомогенной, слегка «молочной» суспензии. Предметное стекло должно находиться на темной поверхности. Результат оценивается невооруженным глазом, путем удерживания предметного стекла перед источником света на черном фоне и покачивания предметного стекла (вперед-назад). Для исключения спонтанной агглютинации необходимо одновременно поставить отрицательный контроль, используя физиологический раствор вместо тест-реагента.
**1.2** Если не удалось обнаружить H-антиген описанным выше методом, штамм необходимо пересеять на агар роения, чтобы стимулировать образование жгутиковых антигенов. В качестве агара роения мы рекомендуем использовать готовую к применению питательную среду sifin REF TN 1702. Залейте чашку Петри (диаметром 6 см) агаром роения в количестве 10 мл после его расплавления. После застывания агара оросите его поверхность примерно 100 мкл стерильной дистиллированной воды и инокулируйте штамм в виде «точки» в центре чашки. Инкубируйте чашку Петри в перевернутом состоянии в течение ночи при температуре 35...37 °C. Для проведения реакции агглютинации на предметном стекле материал собирается с краев чашки Петри.
### 2. Фазово-индукционный тест:
Если штамм является двухфазным, но возможна идентификация только одной H-фазы, требуется индуцировать экспрессию второй фазы (фазовая индукция методом Свена Гарда).
**2.1.** Перемешайте 0,1—0,2 мл тест-реагента Anti-Salmonella H с 10 мл расплавленного агара роения (охлажденного до 40...45 °C) в чашке Петри диаметром 6 см. После застывания агара оросите чашку дистиллированной водой (см. пункт 1.2), засейте ее штаммом Salmonella, инкубируйте и поставьте реакцию агглютинации на предметном стекле. Если индуцировать фазу не удалось, выполните повторную попытку.
**2.2.** В качестве альтернативы классической процедуре мы рекомендуем использовать следующий упрощенный метод. На чашку Петри (диаметром 6 см) с 10 мл агара роения нанесите каплями 0,1—0,2 мл тест-реагента Anti-Salmonella H и распределите материал по поверхности стерильным стеклянным шпателем. Затем инокулируйте штамм в центральную часть чашки и инкубируйте (как описано выше). Через 16—20 часов «проящиеся» штаммы можно использовать для идентификации второй H-фазы. Данный упрощенный метод обычно позволяет идентифицировать антиген второй фазы с первой попытки.

**Оценка результатов**: Оценка результатов исследования допускается, только если отрицательный контроль остается молочно-мутным.
**Положительная реакция:** видимая агглютинация после покачивания пробы вперед-назад менее 20 раз. В случае выраженной положительной реакции агглютинация (крупные или мелкие хлопья) происходит сразу же после перемешивания с бактериальной массой. Если результат слабоположительный, агглютинация происходит только после покачивания предметного стекла вперед-назад 10—20 раз.
**Отрицательная реакция:** если суспензия остается молочно-мутной, или если реакция начинается только после покачивания предметного стекла вперед-назад более 20 раз, результат является отрицательным.

**Обеспечение качества при выполнении теста:** Для обеспечения качества серологической типизации с помощью агглютинации на предметном стекле важно, чтобы используемые для этого штаммы хорошо экспрессировали свои антигены на поверхности клетки. Поэтому для контроля качества рекомендуется использовать штаммы из циклов испытаний, полностью охарактеризованные внешне полевые штаммы определенного происхождения или подходящие, коммерчески доступные штаммы антигенов *Salmonella* O, H.

**Ограничения метода**: Тест-реагенты дают реакцию только со штаммами *Salmonella*, содержащими заявленные антигены. Перекрестная реактивность со штаммами бактерий других родов семейства *Enterobacteriaceae* не обнаружена. Выявление H-антигенов происходит после серологического выявления O-антигена (-ов) и биохимического установления принадлежности к роду *Salmonella*.

## Разъяснение используемых символов

| | |
|---|---|
| LOT | Код партии (серии) |
| REF | Номер по каталогу |
| IVD | Медицинское устройство для диагностики in vitro |
| TR | Тест-реагент |
| mTR | Моноклональный тест-реагент |
| PI | фазовой индукции |
| | Использовать до ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) |
| | Верхний температурный предел |
| | См. инструкцию по применению |
| | агглютинация на предметном стекле |
| LYO | лиофилизат |

Дата редакции: 21/07/2015