




| | | |
|---|--|---|
|  | Anti-Salmonella H | |
| | Testreagenz für die Objektträgeragglutination und Phaseninduktion (PI) | |
| | INFORMATION ZUM GEBRAUCH DURCH FACHPERSONAL |   |
| 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 (NaN₃) 0,9 mg/ml

| 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,z; ¹⁾ e,n,z; ²⁾ e,n,x,z ^{2b} | 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:f,y; f,W; f,z; ¹⁾ f,z; ²⁾ f,z; ^{2b} f,z; ^{2b} z ^{2b} | 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,z; ¹⁾ e,n,x,z ^{2b} | 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,z ^{2b} | |
| H:y | H:y | x |
| H:z ¹⁾ | H:z (I, II, III) | x |
| H:z ₁ z ₂ | H:z ₁ z ₂ ; z ₄ z ₅ ; z ₄ z ₂ ; z ₄ z ₂ z ₂ | |
| H:z ₆ | H:z ₆ | |
| H:z ₁₀ | H:z ₁₀ | x |
| H:z ₁₅ | H:e,n,z ₁₅ ; e,n,x,z ₁₅ | |
| H:z ₂₀ | H:z ₄ z ₂ ; z ₄ z ₂ z ₂ | |
| H:z ₂₄ | H:z ₄ z ₂₄ | |
| H:z ₂₈ | H:f,z ₂₈ ; f,z ₂₈ z ₂₈ | |
| H:z ₂₉ | H:z ₂₉ | |
| H:z ₃₀ | H:z ₄ z ₃₀ | |
| H:z ₃₅ | H:z ₃₅ | x |
| H:z ₃₉ | H:z ₃₉ | x |
| H:z ₄₁ | H:z ₄₁ | 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 H:z 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 Flaschen 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. Testreagenzien sind bei unzureichender Gelegenheit 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 (fötale Kalbserum, 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 einarbeiten. 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 Glasspatel 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 gehemmen 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

| | | | |
|--|------------------------------------|---|--|
|  | Chargennummer (Chargenbezeichnung) |  | Verwendbar bis JJJJ-MM (MM = Monatsende) |
|  | Bestellnummer |  | Temperaturbegrenzung |
|  | In-vitro-Diagnostikum |  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Testreagenz |  | Objektträgeragglutination |
|  | Monoklonales Testreagenz |  | lyophilisiert |
|  | Phaseninduktion | | |

| | | |
|--|--|---|
|  | Anti-Salmonella H | |
| | Réactif d'essai pour l'agglutination sur lame et l'induction de phase (PI) | |
| | INFORMATION À L'USAGE DES PROFESSIONNELS |   |
| 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 sérovat. 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 surnaageants de culture cellulaire de lignées cellulaires d'hybridomies qui sécrètent 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 (NaN₃) 0,9 mg/ml

| 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,z; ¹⁾ e,n,z; ²⁾ e,n,x,z ^{2b} | 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:f,y; f,W; f,z; ¹⁾ f,z; ²⁾ f,z; ^{2b} f,z; ^{2b} z ^{2b} | 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,z; ¹⁾ e,n,x,z ^{2b} | 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,z ^{2b} | |
| H:y | H:y | x |
| H:z ¹⁾ | H:z (I, II, III) | x |
| H:z ₁ z ₂ | H:z ₁ z ₂ ; z ₄ z ₅ ; z ₄ z ₂ ; z ₄ z ₂ z ₂ | |
| H:z ₆ | H:z ₆ | |
| H:z ₁₀ | H:z ₁₀ | x |
| H:z ₁₅ | H:e,n,z ₁₅ ; e,n,x,z ₁₅ | |
| H:z ₂₀ | H:z ₄ z ₂₀ ; z ₄ z ₂₀ z ₂₀ | |
| H:z ₂₄ | H:z ₄ z ₂₄ | |
| H:z ₂₈ | H:f,z ₂₈ ; f,z ₂₈ z ₂₈ | |
| H:z ₂₉ | H:z ₂₉ | |
| H:z ₃₀ | H:z ₄ z ₃₀ | |
| H:z ₃₅ | H:z ₃₅ | x |
| H:z ₃₉ | H:z ₃₉ | x |
| H:z ₄₁ | H:z ₄₁ | 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 H:z 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'emploi. 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'induction 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.

Risque: l'opn travaille avec des matériaux pathogènes natis 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-Kauffmann-Le-Minor, boîtes de Petri stériles (6 cm de diamètre), gelose 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 gelose inclinée issue d'une sous-culture de 16 à 20 heures (par ex. gelose 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 gelose d'essaimage pour une meilleure imprégnation des antigènes de flagelle. En gelose d'essaimage, nous recommandons le milieu nutritif prêt à l'emploi sifin REF|TN 1702. On verse 10 ml de cette gelose d'essaimage après liquéfaction dans une boîte de Petri (6 cm de diamètre). Une fois solidifiée, cette surface de gelose 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 gelose 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 gelose d'essaimage liquéfiée, refroidie à 40...45 °C dans une boîte de Petri de 6 cm de diamètre. Après la solidification de la gelose, on mouille la plaque avec de l'eau distillée comme indiqué en 1.2. On l'ensemencé 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 gelose 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 essayée. Le procédé simplifié permet en règle générale de détecter la seconde phase à la première tentative.

Evaluation du résultat

Eine 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 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

| | | | |
|---|---|---|--|
|  | Code du lot |  | Utiliser jusque AAAA-MM (MM = fin du mois) |
|  | Référence du catalogue |  | Limites de température |
|  | Dispositif médical de diagnostic in vitro |  | Consulter les instructions d'utilisation |
|  | Réactif d'essai |  | l'agglutination sur lame |
|  | Réactif d'essai monoclonal |  | lyophilisé |
|  | l'induction de phase | | |

| | | |
|--|--|--|
|  | Anti-Salmonella H | |
| | Test reagent for slide agglutination and phase reversal (PR) | |
| | INFORMATION FOR PROFESSIONAL USE | |

Anti-Salmonella H

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

INFORMAZIONI PER L'USO PROFESSIONALE



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 sustrati 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 (NaN₃) 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,z; e,n,x,z ¹⁶ | 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:f,v; f,w; f,z; f,zs; f,zs,zs | 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,z; e,n,x,z ¹⁶ | 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,z ¹⁶ | |
| H:y | H:y | x |
| H:z ¹⁾ | H:z (I, II, III) | x |
| H:z ₁ z ₂ | H:z ₁ z ₂ ; z ₁ z ₂ ; z ₂ z ₁ ; z ₁ z ₂ z ₁ z ₂ | |
| H:z ₆ | H:z ₆ | |
| H:z ₁₆ | H:z ₁₆ | x |
| H:z ₁₅ | H:e,n,z ₁₅ ; e,n,x,z ₁₅ | |
| H:z ₂₁ | H:z ₁ z ₂ z ₁ ; z ₁ z ₂ z ₁ z ₂ | |
| H:z ₂₄ | H:z ₁ z ₂₄ | |
| H:z ₂₈ | H:f,z ₂₈ ; f,z ₂₈ z ₂₈ | |
| H:z ₂₉ | H:z ₂₉ | |
| H:z ₃₂ | H:z ₄ z ₃₂ | |
| H:z ₃₅ | H:z ₃₅ | x |
| H:z ₃₉ | H:z ₃₉ | x |
| H:z ₄₁ | H:z ₄₁ | 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 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 possono 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 reagenti di prova possono presentare una torbidità non di origine microbica. Tale torbidità non 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 dovrebbero 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

Vetri, 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.

Materiali e 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. Trasferirli 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 agglutinzioni 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. Miscelare 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), inocularvi 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 cospargervi 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 siama può essere utilizzato per identificare la seconda fase H. Solitamente questa procedura semplificata permette di identificare la seconda fase in un 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 fiocoso 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

Al 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 vengono 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 antigeni/O e all'assegnazione biochimica del gene *Salmonella*.

Spiegazione dei simboli utilizzati

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

Data di revisione: 10/09/2019

Anti-Salmonella H

Tesztreagens tárgylemez-agglutinációhoz és fázisváltáshoz (PR)

PROFESSZIÓÁLIS ALKALMAZÁSI UTASÍTÁS



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 szerovariáció meghatározását.

Az alsóbb táblázatban felsorolt tesztreagensek és tesztzserumok difúziós 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 tesztreagensek 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, tesztzserumok vagy monoklonális antitestek és tesztzserum keveréke. Az antitesteket a megfelelő *Salmonella* H antigénnel szemben antitesteket kiválasztó hibridóma sejtvonalakészületek szubmatnásiából állítják elő. A tesztzserumok immunizált nyúlzserumok, amelyekből a nem specifikus agglutinineket kimerítéssel eltávolították.

Tartósítószer: nátrium-azid (NaN₃), 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,z; e,n,x,z ¹⁶ | 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:f,v; f,w; f,z; f,zs; f,zs,zs | 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,z; e,n,x,z ¹⁶ | 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,z ¹⁶ | |
| H:y | H:y | x |
| H:z ¹⁾ | H:z (I, II, III) | x |
| H:z ₁ z ₂ | H:z ₁ z ₂ ; z ₁ z ₂ ; z ₂ z ₁ ; z ₁ z ₂ z ₁ z ₂ | |
| H:z ₆ | H:z ₆ | |
| H:z ₁₆ | H:z ₁₆ | x |
| H:z ₁₅ | H:e,n,z ₁₅ ; e,n,x,z ₁₅ | |
| H:z ₂₁ | H:z ₁ z ₂ z ₁ ; z ₁ z ₂ z ₁ z ₂ | |
| H:z ₂₄ | H:z ₁ z ₂₄ | |
| H:z ₂₈ | H:f,z ₂₈ ; f,z ₂₈ z ₂₈ | |
| H:z ₂₉ | H:z ₂₉ | |
| H:z ₃₂ | H:z ₄ z ₃₂ | |
| H:z ₃₅ | H:z ₃₅ | x |
| H:z ₃₉ | H:z ₃₉ | x |
| H:z ₄₁ | H:z ₄₁ | 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 H:z azonosítására az I, II és III subspeciesekben

A termék kísérletének 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 címken 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 címken feltüntetett időponton túl azonban nem használhatók fel. A tesztreagensek esetenként nem mikrobiális eredetű zavarosság mutakozhat. 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 zárható. Mivel a készítmények állati eredetű anyagot tartalmaznak (magrati bojtízserumot, stabilizátort), potenciálisan fertőző anyagnak tekintendők, és ennek megfelelően kezelendők. A tesztreagensek, amelyek biológiai eredetű anyagot (nyúlzserum) tartalmaznak, potenciálisan fertőző anyagnak tekintendők, és ennek megfelelően kezelendők.

Tekintve, hogy a készítmények nátrium-azidot tartalmaznak, a bórról és nyálkahártyával való érintkezést kerülni kell. Ha mégis a bőrre vagy nyálkahártyára kerülnek, bő vízzel kell lemosni. Mivel a tárgylemez-agglutinációs próba elő körözököttségű végzett tevékenységét is tartalmaz, minden szükséges munkavédelmi eljárást be kell tartani (fertőzésveszély!)

Nem szállított anyagok és eszközök

Vagy tárgylemez, keverőpálca, fiziológis 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 vízfűző, hőmérő.

Vizsgálati anyagok és módszerek

1. Az antigén meghatározása

1.1 Vegyünk ki kis mennyiségű baktériumtömeget 16-20 óras szubkultúrából (pl. nutrient agar vagy Kligler táptalaj), a fedőlemez alá, nedvesebb rétegtől. Vigyük 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 leolvásása 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 fiziológis 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 készáptalaját ajánljuk, REF TN 1702. Felolvasztás után helyezzünk 10 ml-t ebből a swarm agarból egy petricsészebe (6 cm átmérőjű). Ha az agar megszilárdul, permetezzük be a felületet kb. 100 µl steril desztillált vízzel, és vigyük fel a törzset pont formájában a lemez közepére. Az agarréteget lefele fordítva, egy éjszakán át 35-37 °C-on inkubáljuk a petricsészei. A tárgylemez-agglutinációs próbához a cseste szeleőről gyűjtünk anyagot.

2. Fázisváltás

Ha a törzs difúziós, de csak egy H-fázis azonosítható, a fázisinverziós eljárást (Sven Gard módszer) kell elvégezni a második fázis indukálásához.

2.1. Keverjük 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 petricsészeben. Miután az agar megszilárdult, permetezzük le a lemezt desztillált vízzel (az 1.2 alatt leírt módon), oltuk be a Salmonella törzssel, 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 felszínen steril üvegpattalával. Ezután oltuk be a lemez közepét, és a fentiekben leírt módon inkubáljuk. 16-20 óra után a kirajzolt 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.

Posztív: szemmel látható agglutináció, ha a mintát kevésbé, mint 20 alkalommal előre-hátra billentjük. Kifejezett pozitív reakció esetén az agglutináció (durva vagy finom pehelysedés) azonnal megjelenik, amikor a baktériumtömeget bekeverjük. 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 kell fellépni, ha már több mint 20 alkalommal előre-hátra billenttük a tárgylemezt, az eredmény negatív.

Minőségbiztosítás a teszt elvégzésekor

A szerológiai tipizálás tárgylemez es agglutináció útján történő minőségellenőrzéséhez fontos, hogy az ehhez alkalmazott törzsek antigenjei a sejtfelületen jól expresszálódnak. Ezért ajánlott körvizsgálatokból származó törzseket, exten teljesen lemezzelt, 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 specificitási antigéneket tartalmaznak.

Az Enterobacteriaceae más nemzetségeinek törzseivel keresztreakciót nem mutatnak 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 | Sarzszzám |  | Felhasználható -ig éééé-hh (hh = hónap vége) |
| REF | Rendelési szám |  | Hőmérséklettartomány |
| IVD | In vitro diagnosztikum |  | Tartsa be a Használati utasítást |
| TR | Tesztreagensek | | |