



Instrukcja używania

SUROWICA DO AGLUTYNACJI SZKIEŁKOWEJ BAKTERII *SALMONELLA* (SUROWICA *SALMONELLA*)

Zastosowanie

Surowice do aglutynacji szkiełkowej bakterii *Salmonella* są wyrobem medycznym do diagnostyki *in vitro* służącym do jakościowych badań serologicznych szczepów bakterii *Salmonella* pobranych od ludzi, zwierząt lub innego materiału badawczego.

Opis

Surowice do aglutynacji szkiełkowej bakterii *Salmonella* są absorbowanymi surowicami króliczymi poliwalentnymi lub monowalentnymi. Zawierają przeciwciała dla grupowych i pojedynczych czynników antygenów somatycznych, rzęskowych i antygenów otoczkowego Vi. Pozwalają one na identyfikację serologiczną szczepów bakterii *Salmonella* występujących w Polsce i na świecie. Surowice do hamowania faz są przeznaczone do indukcji niewykrywalnej fazy rzęskowej, którą można przeprowadzić poprzez hodowlę na miękkim podłożu agarowym, w przypadku szczepów dwufazowych, w których jedna faza jest dominująca, a druga utajona.

Surowice są kontrolowane z zestawem ok 200 szczepów kontrolnych.

Surowice znajdują się w szklanych butelkach z zakraplaczem. Są przygotowane w postaci gotowej do użycia.

Surowice należy stosować do diagnostyki serologicznej bakterii rodzaju *Salmonella*.

Produkt przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnego zastosowania laboratoryjnego przez przeszkolony personel z zachowaniem podstawowych zasad antyseptyki i aseptyki.

Skład

Surowice do aglutynacji szkiełkowej pałeczek *Salmonella* są wykonane z przeciwciał poliklonalnych pozyskanych od zwierząt immunizowanych inaktywowanymi szczepami bakterii, absorbowane w celu uzyskania wybranych przeciwciał oraz rozcieńczone 0,85% NaCl i konserwowane 0,01% tiomersalem.

Właściwości

Identyfikacja szczepu polega na ustaleniu struktury antygenowej badanego szczepu. Opiera się na wykrywaniu antygenów somatycznych „O” i antygenów rzęskowych „H”. Szczepy *S. Typhi* najczęściej posiadają antygen powierzchniowy „Vi”, który jest wykrywany w aglutynacji z surowicą anti-Vi. Antygeny powierzchniowe bakterii tworzą widzialne gołym okiem kompleksy ze swoistymi przeciwciałami zawartymi w surowicy (reakcja aglutynacji).

Surowice do aglutynacji szkiełkowej bakterii *Salmonella* przeznaczone do identyfikacji antygenów somatycznych: A(O:2); B(O:4); C(O:7,O:8); D(O:9,46); E(O:3,10,15) E₄(O:1,3,19); G(O:13,22,23); O:2; O:3; O:3,10; O:4; O:6₁; O:6,7; O:7; O:8; O:8,20; O:9; O:10; O:11; O:12; O:13(OG) O:13,22; O:13,23; O:14(H); O:14,24; O:15; O:18; O:19; O:20; O:21; O:22; O:23; O:28; O:35; O:41; O:46; surowica przeznaczona do identyfikacji antygenów otoczkowych: Vi; surowice przeznaczone do identyfikacji antygenów rzęskowych: H:a; H:b; H:c; H:d; H:i; H:g,m; H:g,p; H:f,g; H:g, H:m; H:p; H:f; H:g; H:s; H:t; H:u; H: e,h; H: h; H: e,n,x; H: n; H: x; H: k; H: l,v; H: v; H: l,w; H:w; H:r; H:y; H:1,2,5; H:2; H:5; H:6; H:7; H:z; H:z₆; H:z₁₀; H:z₁₃ H:n,z₁₅; H: z₄,z₂₃; H:z₂₃; H:z₂₄; H:z₂₆; H:z₂₉; H:z₃₅; H:z₃₆; H:z₃₈; H:z₃₉; H:z₄₂; H:z₅₃; H:z₅₇; surowice do hamowania: H:i, H:r, H:2, poliwalentne surowice: HM (zawierająca przeciwciała przeciw wszystkim znanym antygenom rzęskowym), OM (zawierająca przeciwciała przeciw wszystkim znanym antygenom somatycznym), OMA (O:A,B,D,D₂E,E₄); OMB (O:C,C₃ 11,13,6,14); HE (eh,enz,enz₁₅); HG (fg,fgs,gm,gmq,gmt,gp,gpu,gst,gq); HL (lv,lw,lz₁₃,lz₂₈); HZ₄ (z₄,z₂₃,z₂₄); H1 (1,2,5,6,7); Hq,s,t,p,u.

Sposób użycia**Przygotowanie próbek**

Próbki należy pobrać do sterylnych pojemników, przetransportować do laboratorium oraz przetwarzać zgodnie z wytycznymi dla danego rodzaju próbek. Należy wybierać wyraźnie ograniczone, typowe kolonie. Do testów należy używać niezanieczyszczonych hodowli bakteryjnych.

Przygotowanie badanych szczepów

Badane szczepy hodować w temperaturze od +34 do +38°C przez 24±3 godziny na podłożach stałych (dla określenia antygenów somatycznych i antygenów otoczkowego Vi – agar 1,5% posiew powierzchniowy dowolną metodą; dla antygenów rzęskowych - agar 0,5% posiew punktowy w centralnej części płytki). (Rekomendowane: agar 1,5% - Immunolab, nr katalogowy PG002, PGS02 oraz podłoże agarowe miękkie wg Garda 0,5% - Immunolab, nr katalogowy PG001, PGS01).

Wykonanie odczynu aglutynacji szkiełkowej

Przed użyciem surowice doprowadzić do temperatury pokojowej (od +18 do +25°C), a w przypadku zmętnienia odwirować.

W celu zachowania jakości produktu (której brak może uniemożliwić wykonanie oznaczenia lub właściwą interpretację wyników), wykonanie testu powinno odbywać się w warunkach uniemożliwiających kontaminację lub skażenie produktu.

Przed wykonaniem testu aglutynacji szkiełkowej badanego szczepu z użyciem surowic, należy w pierwszej kolejności wykonać kontrolę z użyciem 3% roztworu chlorku sodu. Wystąpienie aglutynacji w 3% roztworze NaCl wskazuje na to, że badany szczep jest w fazie R (szczep szorstki) i nie nadaje się do identyfikacji serologicznej w odczynie aglutynacji szkiełkowej.

1. Na odtłuszczonym szkiełku podstawowym umieścić kroplę surowicy. Objętość kropli wydawanej przez kropielnicę wynosi ok. 40µl. Możliwe jest wykonanie testu mniejszą kroplą surowicy ok 20µl, pobraną za pomocą pipety automatycznej.

2. Jąłową eżą/bagietką pobrać szczep z podłoża i umieścić obok kropli. Do badania antygenów somatycznych i otoczkowego odpowiedni jest materiał pobierany z dowolnego miejsca na płytce, natomiast do badania antygenów rzęskowych odpowiedni jest materiał pobierany z peryferyjnych miejsc płytki. Zaleca się pobieranie do badań materiału z kilku miejsc jednocześnie.

3. Rozetrzeć szczep na szkiełku i połączyć z surowicą tak, aby powstała jednolita zawiesina.

4. Kołyszając lekko szkiełkiem, ruchem kolistym przez **10 – 30 sekund (najdłużej do 1 minuty!)**, obserwować wynik reakcji. *Uważaj, aby kropla nie ściekła ze szkiełka!*

Aglutynacja jest lepiej widoczna, jeżeli wynik reakcji obserwuje się nad ciemnym tłem z użyciem lupy o 5-cio krotnym powiększeniu.

Odczyt i interpretacja wyników

W celu określenia serotypu badanego szczepu należy określić skład antygenowy szczepu przy pomocy surowic zawierających przeciwciała przeciwko antygenom somatycznym i rzęskowym zgodnie ze schematem White'a-Kauffmanna-Le Minora. Należy uwzględnić charakter odczynu: aglutynacja drobno-grudkowa charakterystyczna dla antygenów somatycznych i antygeny Vi, oboczowa dla antygenów rzęskowych. Wystąpienie aglutynacji jest dodatnim wynikiem reakcji. Brak aglutynacji jest ujemnym wynikiem reakcji.

Odczytu aglutynacji należy dokonać wg następującej skali:

+++ obecne aglutynaty rozmieszczone w całej przezroczystej kropli lub na jej obwodzie,

++ obecne aglutynaty rozmieszczone w półprzezroczystej kropli,

+ obecne drobne aglutynaty na obrzeżu lub na dnie kropli, kropla mlecznobiała. Wynik taki nie pozwala na ustalenie rozpoznania.

Najczęściej występuje w szczepach dwufazowych z silnie rozwiniętą jedną z faz. W celu ustalenia składu antygenów rzęskowych należy zahamować fazę silnie rozwiniętą.

(-) brak aglutynatów, kropla mlecznobiała.

! Nie dopuszczać do wyschnięcia kropli, ponieważ daje to wynik fałszywie pozytywny.

Na naszej stronie <http://immunolab.com.pl/film> zamieszczono film instruktażowy zawierający instrukcję wykonania badania i interpretacji wyników.

Wykonanie hamowania fazy

W przypadku szczepów dwufazowych, gdy badany szczep wykazuje reakcję pozytywną tylko z surowicą przeciwko antygenom jednej z faz (faza dominująca), a druga faza jest niewykrywalna (faza utajona), należy przeprowadzić hamowanie fazy dominującej w celu indukcji fazy utajonej.

W tym celu należy:

1. Sclądzić przygotowane, płyne podłoże agarowe miękkie 0,5% wg Garda do temperatury ~ +45°C.
2. Nakropić na środek dna małej, sterylnej płytki Petriego (Ø ok.5 cm) 100-200µl surowicy do hamowania. Należy zachować ostrożność, aby nie dotykać podłoża końcówką zakraplacza.
3. Do nakropionej surowicy dodać ok. 10 ml podłoża agarowego miękkiego 0,5% wg Garda i wymieszać delikatnie kołyszając płytką.
4. Pozostawić płytkę w temperaturze pokojowej, aż do stężenia agaru. (Nie suszyć!)
5. Za pomocą jałowej ezy pobrać hodowlę szczepu do hamowania (z płytki agarowej 0,5%) i zaszczyć na podłożu agarowym w centralnej części płytki.
6. Inkubować przez noc w temperaturze od +34 do +38°C. Nie odwracać płytki wieczkiem do dołu!
7. Materiał z peryferyjnych części płytki jest odpowiedni do wykonania aglutynacji szkiełkowej.

Wykonanie hamowania fazy- metoda alternatywna

1. Przygotować małą płytkę Petriego (Ø ok.5 cm) z ok. 10ml sterylnej, zestalonego podłoża agarowego miękkiego 0,5% wg Garda. Płytkę przechowywać w pozycji wieczkiem do góry. Nie suszyć!
2. Nakropić na środek płytki z agarem 100-200µl surowicy do hamowania. Należy zachować ostrożność, aby nie dotykać płytki końcówką zakraplacza.
3. Wetrzeć surowicę w powierzchnię agaru za pomocą jałowej głaszczki.
4. Za pomocą ezy pobrać hodowlę szczepu do hamowania (z płytki agarowej 0,5%) i zaszczyć na podłożu agarowym w centralnej części płytki.
5. Inkubować przez noc w temperaturze od +34 do +38°C. Nie odwracać płytki wieczkiem do dołu!
6. Materiał z peryferyjnych części płytki jest odpowiedni do wykonania aglutynacji szkiełkowej.

! Zahamowanie fazy rzęskowej nie zawsze zostaje osiągnięte przy pierwszej próbie. Jeżeli dominująca faza H nie została zahamowana, należy powtórzyć procedurę hamowania przed stwierdzeniem, że druga (lub trzecia) faza nie występuje (szczepy jednofazowe). *Materiał do zaszczenia należy pobrać z płytki, na której przeprowadzano wcześniejsze hamowanie.*

Przykład:

S. Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2-

Faza dominująca H2 → użyć surowicy H:2 do hamowania, wzmocnienie ekspresji fazy H:i

Faza dominująca H:i → użyć surowicy H:i do hamowania, wzmocnienie ekspresji fazy H:2

Kontrola jakości przez użytkownika

W trakcie stosowania surowicy zaleca się testowanie kontrolne z użyciem wzorcowych szczepów *Salmonella* (zarówno kontrole dodatnich jak i ujemnych), w celu zweryfikowania poprawności wykonania metody i działania surowic, postępując analogicznie jak w przypadku szczepów badanych.

Ograniczenia metody

W wyjątkowych przypadkach istnieje możliwość reakcji krzyżowych z innymi gatunkami bakterii z rodziny Enterobacteriaceae (np. szczepy *Citrobacter spp.*, *Hafnia alvei*, *Proteus spp.*, *E. coli* lub *Shigella spp.*) ze względu na wysokie podobieństwo między antygenami lub ich pokrewieństwo. Z tego powodu niezbedne jest badanie biochemiczne w celu ustalenia przynależności badanego szczepu do rodzaju *Salmonella*. Surowice należy stosować do diagnostyki serologicznej wyłącznie czystych hodowli bakterii rodzaju *Salmonella*.

Materiały potrzebne do pracy, które nie wchodzą w skład zestawu

Ciemne tło, eza do posiewów bakteriologicznych, lupa, szkiełka podstawowe, 3% roztwór NaCl, pojemnik na skażone materiały, głaszczka, szalka Petriego, schemat White'a-Kauffmanna-Le Minora, film instruktażowy (dostępny na stronie <http://immunolab.com.pl/film>)

Weryfikacja i walidacja metody

czułość	97% (363/376) ilość wyników prawdziwie dodatnich/ suma ilości wyników prawdziwie dodatnich i fałszywie ujemnych
----------------	--



Instruction for Use

ANTISERUM FOR SLIDE AGGLUTINATION OF *SALMONELLA* (*SALMONELLA* ANTISERUM)

Intended use

The antisera for *Salmonella* slide agglutination assay are an *in vitro* diagnostic medical device. The antisera are used for qualitative identification tests of *Salmonella* serotypes isolated on bacteriological media from human or animal samples or other materials.

Description

The antisera for *Salmonella* slide agglutination assay are composed of the absorbed polyvalent or monovalent rabbit antisera, which contain antibodies against group and single factors of somatic, flagellar or capsular Vi antigens. The antisera allow for serological identification of *Salmonella* serovars occurring in Poland and worldwide. Antisera for phase inversion are designed for the phase induction in 2-phase bacteria with inhibited expression of one phase of H-antigens. It can be obtained by culturing *Salmonella* on swarm agar containing antisera for phase inversion.

Quality control of antisera is carried out with a set of approx. 200 *Salmonella* strains.

The ready to use antisera are sold in glass bottles with a dropper.

Antisera are designed for serological diagnostics of bacteria belonging to *Salmonella* genus.

Product for professional laboratory application, should only be used by qualified personnel following basic aseptic and antiseptic principles.

Composition

Antisera for slide agglutination of rod shaped *Salmonella* are produced from polyclonal antibodies obtained from animals vaccinated with inactivated bacterial strains. In order to contain only specific antibodies, they undergo the process of absorption and are suspended in 0,85% NaCl and preserved with 0,01% thiomersal.

Properties

Identification of *Salmonella* serovars relies on the recognition of the antigen structure of the tested strain. Serological characterization is based upon the detection of 3 antigenic components: somatic "O" antigens, flagellar "H" antigens or capsular "Vi" antigen. Capsular "Vi" antigen can be found only in certain strains e.g. *S. Typhi*, and can be detected by slide agglutination assay with anti-Vi antiserum. Bacterial surface antigens form visible complexes with specific antibodies in the serum (agglutination reaction).

The antisera designed for the identification of *Salmonella* somatic antigens in slide agglutination assay consists of: A(O:2); B(O:4); C(O:7,O:8); D(O:9,46); E(O:3,10,15); E4(O:1,3,19); G(O:13,22,23); O:2, O:3, O:4; O:6, O:6.7; O:7; O:8; O:8,20; O:9; O:10; O:11; O:12; O:13(OG); O:13,22; O:13,23; O:14 (O:H), O:14,24; O:15; O:18; O:19; O:20; O:21; O:22; O:23; O:28; O:35; O:41; O:46; antiserum Vi used for identification of capsular antigen Vi; antisera used for identification of flagellar antigens: H:a; H:b; H:c; H:d; H:i; H:g,m; H:g,p; H:f,g; H:m; H:p; H:f; H:q; H:s; H:t; H:u; H:e,h; H:h; H:e,n,x; H:n; H:x; H:k; H:l,v; H:v; H:l,w; H:w; H:r; H:y; H:1,2,5; H:2; H:5; H:6; H:7; H:z; H:z6; H:z10; H:z13 H:n,z15; H:z4,z23; H:z23; H:z24; H:z28; H:z29; H:z35; H:z36; H:z38; H:z39; H:z42; H:z52; H:z53; H:z57; antisera for phase inversion: H:i, H:2, H:r; polyvalent antisera: HM (containing antibodies against all known flagellar antigens), OM (containing antibodies against all known somatic antigens), OMA (O:A,B,D,D,E,E₄); OMB (O:C,C₂,11,13,6,14); H:E (eh,enx,enz₁₅); H:G (fg,fgs,gm,gmq,gmt,gp,gpu,gt,gst,gq); H:L (lv,lw,lz,lz₂₈); H:Z4 (Z₄Z₂₃,Z₄Z₂₄); and H:1 (1,2,5,6,7); Hq,s,t,p,u.

Method**Preparation of samples**

Samples should be collected in sterile containers, transported to the laboratory and processed according to the guidelines for required type of samples. Clearly distant, typical colonies with no signs of contamination should be chosen to perform the slide agglutination assay.

Preparation of tested strains

Culture the tested strains at the required temperature, ranging from +34°C to +38°C for 24±3 hours on nutrient agar media (for identification of somatic antigens and capsular antigen Vi use 1,5% solid medium, surface inoculation using any method; for flagellar antigens use 0,5% semi-solid medium, spot inoculation in the central part of the plate). (1,5% agar medium produced by Immunolab, catalog No. PG002, PGS02 and 0,5% Sven Gard swarm agar by Immunolab, catalog No. PG001, PGS01 are recommended).

Performance of slide agglutination assay

Antisera should be brought to room temperature (from +18 to +25°C) prior to using them. If turbidity of antiserum is observed, it should be centrifuged.

In order to maintain the sterility of the product (the lack of which could make it impossible to perform the assay or make correct interpretation of the results), the test should be performed in conditions that prevent any contamination of the product. First of all, before performing slide agglutination assay, a negative control of tested strain with 3% NaCl solution should be carried out. The occurrence of agglutination in a 3% NaCl solution indicates that the tested strain is in phase R (rough strain) and it is not suitable for serological identification in slide agglutination assay.

- Place a drop of antiserum on the degreased glass slide. The volume of the drop dispensed by the dropper is approximately 40µl. It is possible to perform the test with a smaller drop of serum, approximately 20µl, taken with an automatic pipette.
- With the use of a sterile wire loop/baguette, collect bacteria from the medium and place them next to the drop. For the examination of somatic and capsular antigens, material can be collected from any location on the plate, whereas for the examination of flagellar antigens, material should be collected from the peripheral areas of the plate. It is recommended to collect material from multiple locations simultaneously for testing.
- While spreading the strain on the slide, mix it with the serum to form a homogeneous suspension.
- While gently rocking the slide with circular motions for **10 - 30 seconds (max. till 1 minute!)**, observe the reaction. Be careful that the drop does

swoistość	99% (594/598) (ilość wyników prawdziwie ujemnych/ suma ilości wyników prawdziwie ujemnych i fałszywie dodatnich)
powtarzalność	98% (795/810) (ilość powtórzonych zgodnych wyników reakcji/całkowita liczba wyników)
odtworzalność	98% (792/810) (ilość odtworzonych zgodnych wyników reakcji/ całkowita ilość wyników)

Warunki przechowywania

- Surowice należy przechowywać w temperaturze **od +2°C do +8°C**.
- Transport do 3 dni w temperaturach dodatnich nieprzekraczających +25°C nie zmienia właściwości produktu.
- NIE ZAMRAŻAĆ!**
- Chronić od światła.
- Nie stosować po upływie terminu ważności zamieszczonego na opakowaniu.
- Surowica jest produktem wielokrotnego użytku.
- Data ważności dotyczy produktu w nienaruszonym opakowaniu, przechowywanego zgodnie z instrukcją oraz produktu po otwarciu, używanego zgodnie z przewidzianym zastosowaniem, w warunkach opisanych w instrukcji oraz przechowywanym po otwarciu zgodnie z instrukcją.
- Nie stosować surowicy o zmienionych cechach fizykochemicznych wskazujących na zanieczyszczenie mikrobiologiczne.
- Nie sterylizować surowicy do użycia.
- W surowicy może pojawić się zmętnienie i/lub osad nie spowodowany zanieczyszczeniem mikrobiologicznym. Surowica nadal nadaje się do użycia, ale konieczne jest jej odwirowanie (8000rpm., przez 15 min.), w celu uzyskania prawidłowych wyników aglutynacji.

Środki ostrożności

- Produkt nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka i środowiska, jeżeli jest użytkowany zgodnie z instrukcją.
- Należy przestrzegać aseptycznej techniki pracy i stosować środki ostrożności w kwestii zagrożenia mikrobiologicznego podczas wykonywania wszystkich procedur.
- Należy ściśle przestrzegać instrukcji użycia.
- Każdy poważny incydent związany z wyrobem należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi państwowemu, w którym użytkownik ma miejsce zamieszkania lub siedzibę.

Środki ostrożności przy pracy z materiałem zakaźnym:

- Surowice królicze zawierają materiał pochodzenia zwierzęcego i należy je traktować jako materiał potencjalnie zakaźny, odpowiednio się z nimi obchodzić.
- Wykonanie testu aglutynacji szkiełkowej wiąże się z pracą z bakteriami chorobotwórczymi, w związku z tym należy przestrzegać wszystkich niezbędnych zasad obowiązujących przy pracy z zakaźnym materiałem mikrobiologicznym. Stosować odzież ochronną i rękawice ochronne. Pobrać materiał do badań oraz materiał na szkiełku zabezpieczyć przed dostępem osób trzecich, z uwagi na możliwość zakażenia osób trzecich. Zużyte szkiełka z surowicą i materiałem zakaźnym, oraz inne materiały skażone należy poddać sterylizacji w autoklawie lub postępować zgodnie z obowiązującymi zasadami w laboratorium.

Zawartość jednostkowego opakowania

1 butelka surowicy z zakraplaczem zawiera:

- 5 ml surowicy - ok. 125 oznaczeń przy użyciu zakraplacza/ok 250 oznaczeń za pomocą pipety automatycznej lub
 - 3 ml surowicy - ok. 75 oznaczeń przy użyciu zakraplacza/ok 150 oznaczeń za pomocą pipety automatycznej lub
 - 2 ml surowicy - ok. 50 oznaczeń przy użyciu zakraplacza/ok 100 oznaczeń za pomocą pipety automatycznej lub
 - 1 ml surowicy - ok. 25 oznaczeń przy użyciu zakraplacza/ok 50 oznaczeń za pomocą pipety automatycznej
- 1 butelka surowicy do hamowania z zakraplaczem zawiera:
- 5 ml surowicy do hamowania - ok. 25 reakcji hamowania lub
 - 3 ml surowicy do hamowania - ok. 15 reakcji hamowania lub
 - 2 ml surowicy do hamowania - ok. 10 reakcji hamowania lub
 - 1 ml surowicy do hamowania - ok. 5 reakcji hamowania.



Producent
Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella „IMMUNOLAB” Sp. z o.o.
Adres: ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, Polska
Tel./Fax: 58 781-44-91
E-mail: info@immunolab.com.pl
www.immunolab.com.pl

Wyjaśnienie użytych symboli:

	Producent		Data ważności: XXX-YY-Z (rok-miesiąc-dzień)
	Numer partii		Zapoznaj się z instrukcją używania
	Numer katalogowy		Zakres temperatury przechowywania
	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>		Zakres temperatury transportu w czasie do 3 dni

Zmiany wprowadzone w aktualnym wydaniu zaznaczono szarym wyróżnieniem.

not drip from the slides.

Agglutination is more visible if the reaction is observed against a dark background with a magnifying glass with 5-fold magnification.

Interpretation of the results

To define the serotype of the tested strain, its antigenic formula needs to be determined with the use of antisera containing antibodies against somatic and flagellar antigens according to the White-Kauffmann Le Minor-classification scheme.

Nature of the reaction should be taken into account: agglutination visible as little lumps is characteristic for the somatic antigens and Vi antigen, as clouldlets for flagellar antigens. Presence of agglutination is a positive reaction. Lack of agglutination is a negative reaction.

Interpretation of agglutination should be made according to the following scale:

- +++ agglutination present, distributed throughout the transparent drop or on its periphery,
- ++ agglutination present, distributed in a semitransparent drop,
- + small agglutination present on the drop's periphery or at the bottom in a milky white drop. Such results cannot be interpreted as positive in serological diagnostics. Such a situation occurs mostly with biphasic strains that have one strongly developed phase and mainly dominant phase is expressed. In order to determine antigens' composition, the dominant phase should be inhibited,
- (-) lack of agglutination, milky white drop.

! Do not let the drop dry out, as it may be interpreted as a false negative result.

An instructional video with detailed information how to perform the test and how to interpret the obtained results is available on our website: <http://immunolab.com.pl/film>

Performance of a phase inversion

In the case of diphasic strains, when the tested strain gives a positive reaction with only one out of two phases (dominant phase) and the second phase cannot be determined (latent phase), it is necessary to perform phase inversion in order to impede the dominant phase and induce the latent phase.

In order to do that, the following steps should be taken:

1. Prepare the semi-solid 0,5% Sven Gard swarm agar and allow it to cool to ~+45°C.
2. Place a couple of drops (100-200µl) of inhibitory antiserum into the middle of a small Petri dish (Ø approx. 5 cm). It is necessary to pay attention and not to touch the surface of a Petri dish with a dropper.
3. Add approximately 10 ml of 0,5% Sven Gard swarm agar and mix gently with an antiserum by circular motions.
4. Allow the medium to cool and solidify at room temperature. Do not dry the medium!
5. With the use of a sterile wire loop, inoculate the strain to be inverted, at a single point in the center of a Petri dish. For inversion use bacteria previously grown on 0,5% Sven Gard swarm agar.
6. Incubate the inoculated plate overnight, at temperatures ranging from +34 to +38°C. Do not place the Petri dish upside down!
7. The swarmed strain from the peripheral parts of a plate can be used to identify the second phase in slide agglutination assay.

Performance of a phase inversion - an alternative method

1. Prepare a small Petri dish (Ø approx. 5 cm) with approx. 10 ml of sterile, semi-solid 0,5% Sven Gard swarm agar. Store the plate with the lid up. Do not dry the medium!
2. Add a couple of drops (100-200µl) of inhibitory antiserum into the middle of a plate with a nutrient medium. It is necessary to pay attention and not to touch the surface of a medium with a dropper.
3. Spread the antiserum over the surface with a sterile (glass) spatula.
4. With the use of a sterile wire loop, inoculate the strain to be inverted at a single point in the center of a dish. For inversion use bacteria previously grown on 0,5% Sven Gard swarm agar.
5. Incubate the inoculated plate overnight, at temperatures ranging from +34 to +38°C. Do not place the Petri dish upside down!
6. The swarmed strain from the peripheral parts of a plate can be used to identify the second phase in slide agglutination assay.

! Phase inversion is not always achieved at the first attempt. When necessary, the procedure should be repeated before concluding that the organism has no alternative phase 2 (or phase 3) (monophasic strains). *The bacteria for further inoculation should be collected from the plate used during the first attempt.*

An example:

S.Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2

Dominant H2 phase → use antiserum H:2 for phase inversion to suppress dominant phase and, enhance expression of phase H:i

Dominant H:i phase → use antiserum H:i for phase inversion to suppress dominant phase and enhance expression of phase H:2

User quality control

When using the antiserum, it is recommended to test control the method with the reference *Salmonella* strains (both positive and negative controls) in order to verify the correctness of the method and the reactions of the antiserum, proceeding in the same way as in the case of tested strains.

Limitations of the method

In exceptional cases, there is a possibility of cross-reactions with other species of Enterobacteriaceae (e.g. strains of *Citrobacter* spp., *Hafnia alvei*, *Proteus* spp., *E. coli* or *Shigella* spp.) due to their high similarity between antigens or their phylogenetic relationship. For this reason, biochemical tests are necessary to determine whether the tested strain belongs to the *Salmonella* genus. Only pure cultures of *Salmonella* should be used for serological diagnostics.

Materials required to perform the assay, which are not included in the set

Dark background, inoculation loop, magnifying glass, glass slides, solution of 3% NaCl, container for contaminated materials, sterile (glass) spatula, Petri dish, the White-Kauffmann-Le Minor classification scheme, an instructional video (available on our website: <http://immunolab.com.pl/film>).

Validation and verification of the method

sensitivity	97% (363/376) (number of true positive results/ sum of true positive and false negative results)
--------------------	---

specificity	99% (594/598) (number of true negative results/ sum of true negative and false negative results)
repeatability	98% (795/810) (number of repeated compatible results/total number of results)
reproducibility	98% (792/810) (number of reproduced compatible results/ total number of results)

Storage conditions and precautions

- Antisera should be stored at temperatures ranging from +2°C to +8°C.
- Transport up to 3 days in temperatures not exceeding +25°C does not deteriorate the properties of the product.
- **DO NOT FREEZE!**
- Protect from light.
- Do not use after the expiration date stated on the package.
- The antiserum is a reusable product.
- The expiration date applies to the product in intact packaging, stored in accordance with the instructions, and the product after opening, used in accordance with the intended use, in the conditions described in the instructions and stored after opening in accordance with the instructions.
- Do not use antiserum with altered physico-chemical characteristics indicating microbiological contamination.
- Do not sterilize antiserum prior to use.
- Turbidity and/or precipitates not caused by microbiological contamination may appear in the antiserum. The antiserum is still suitable to be used, but must be centrifuged (8000rpm, 15 min) in order to give correct agglutination results.

Precautions

The product does not pose a health threat to humans and the environment, when used according to the instructions.

Aseptic working conditions must be observed and precautions against microbiological hazards should be taken during all procedures.

The instructions for use must be strictly followed.

Any serious incident involving the device should be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user resides or has his place of business.

Precautions when working with infectious material:

- Rabbit antisera contain material of animal origin and should be handled as potentially infectious.
- Performing a slide agglutination assay involves working with pathogenic bacteria, therefore all necessary rules applicable when working with infectious microbiological material must be observed. Wear protective clothing and gloves. Samples collected to perform the assay as well as the material from the slides should be protected against access by third parties, due to the possibility of infection. Slides used in the assay containing antiserum and infectious material, as well as other contaminated materials, should be autoclaved or handled in accordance with applicable laboratory rules.

The content of the package unit

A single antiserum bottle with a dropper contains:

- 5 milliliters of antiserum - approx. 125 tests using dropper/approx. 250 tests using automatic pipette, or
- 3 milliliters of antiserum - approx. 75 tests using dropper/ approx. 150 tests using automatic pipette, or
- 2 milliliters of antiserum - approx. 50 tests using dropper/ approx 100 tests using automatic pipette, or
- 1 milliliter of antiserum - approx. 25 tests using dropper / approx 50 test using automatic pipette

A single phase inversion antiserum bottle with a dropper contains:

- 5 milliliters of inhibitory antiserum allowing to perform approx. 25 phase inversion tests, or
- 3 milliliters of antiserum for phase inversion allowing to perform approx. 15 phase inversion tests, or
- 2 milliliters of for phase inversion antiserum allowing to perform approx. 10 phase inversion tests, or
- 1 milliliter of antiserum for phase inversion allowing to perform approx. 5 phase inversion tests.



Manufacturer

Research and Development Department of Salmonella Center "IMMUNOLAB" Ltd.

Address: ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, Poland

Phone/Fax: 0048 58 781-44-91

E-mail: info@immunolab.com.pl

www.immunolab.com.pl

Explanation of the symbols used



Manufacturer



Expiration date : YYYY-XX-Z (year-month-day)



Batch code (Lot)



Consult instructions for use



Catalogue number



Storage temperature limit



In vitro diagnostic medical device



Transport temperature limit up to 3 days

Changes introduced in the current edition are highlighted in gray.