

Код ОКП 93 9817

УТВЕРЖДАЮ



ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения

**Реагенты для титрования сальмонелл
и серологической диагностики сальмонеллеза в реакции агглютинации
(РДС Sifin)**

Соответствует требованиям национальных стандартов

**ГОСТ Р 51088-97 Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие
технические условия**

**ГОСТ Р ИСО 15194-2007 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин
в пробах биологического происхождения. Описание стандартных образцов.**

2010г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты РДС Sifin предназначены для типирования сальмонелл и серологической диагностики сальмонеллеза в реакции агглютинации.

Код в соответствии с номенклатурным классификатором – 6565 Реагенты и расходные материалы для бактериологических исследований.

Код области медицинского применения – 087 Бактериология.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип действия реагентов основан на взаимодействии антигенов с антителами в реакции агглютинации. Визуально фиксируемая агглютинация (положительная реакция) свидетельствует о наличии данного антигена у исследуемых бактерий или специфических антител в анализируемых образцах сыворотки крови.

Реагенты, предназначенные для типирования сальмонелл, взаимодействуют в реакции агглютинации на предметном стекле только с гомологичными им антигенами этих бактерий. Результаты реакции учитывают визуально на темном фоне после смешивания реагентов на предметном стекле.

Антигены сальмонелл позволяют выявлять антитела к сероварам S. Paratyphi A, B, C, S. Typhi, S. Typhimurium и S. Enteritidis и определять их титр, а по его увеличению (сероконверсии) при исследовании парных проб сыворотки крови, взятой у пациента с интервалом в 14 дней, ставить окончательный диагноз на сальмонеллез.

3. КОМПЛЕКТАЦИЯ

Комплектация поставки реагентов осуществляется по запросу заказчика, составляемого в зависимости от распространенности сероваров сальмонелл в регионе. При составлении заявки на необходимые реагенты пользуются их каталожными номерами, приведенными в Таблице 1.

Таблица 2. Перечень реагентов

Реагенты	Каталожный номер	Объем реагента во флаконе, мл*
1	2	3
Реагенты для типирования сальмонелл		
Омнивалентный энтероклон		
Анти-Salmonella (A – 67)	TR 1101	1
	TR 1105	5
Поливалентные энтероклоны		
Анти-Salmonella I (A – E)	TR 1111	1
	TR 1115	5
Анти-Salmonella II (F – 67)	TR 1121	1
	TR 1125	5
Анти-Salmonella Поли-Н Фазы 1 и 2	TR 1141	1
	TR 1145	5
Группоспецифические энтероклоны		
Анти-Salmonella группа B	TR 1201	1
	TR 5201	5
Анти-Salmonella группа C	TR 1202	1
Анти-Salmonella группа D	TR 1203	1
	TR 5203	5
Анти-Salmonella группа E	TR 1204	1
Моноспецифические энтероклоны и поликлональные антитела к антигенам O, Vi, H сальмонелл		
Анти-Salmonella O 2	TR 1301	1
Анти-Salmonella O 4	TR 1302	1
	TR 5302	5

1	2	3
Анти-Salmonella O 5	TR1303	1
	TR 5303	5
Анти-Salmonella O 6 ₁	TR1304	1
Анти-Salmonella O 7	TR 1305	1
Анти-Salmonella O 8	TR 1306	1
Анти-Salmonella O 9	TR 1307	1
	TR 5307	5
Анти-Salmonella O 10	TR 1308	1
Анти-Salmonella O 11	TR 1323	1
Анти-Salmonella O 13	TR 1325	1
Анти-Salmonella O 14	TR 1309	1
Анти-Salmonella O 15	TR 1310	1
Анти-Salmonella O 16	TR 1328	1
Анти-Salmonella O 17	TR 1329	1
Анти-Salmonella O 18	TS 1330	1
Анти-Salmonella O 19	TR 1311	1
Анти-Salmonella O 20	TR 1312	1
Анти-Salmonella O 21	TR 1331	1
Анти-Salmonella O 22	TS 1332	1
Анти-Salmonella O 25	TR 1335	1
Анти-Salmonella O 27	TR 1313	1
Анти-Salmonella O 28	TR 1336	1
Анти-Salmonella O 30	TR 1339	1
Анти-Salmonella O 34	TR 1314	1
Анти-Salmonella O 35	TR 1341	1
Анти-Salmonella O 38	TR 1344	1
Анти-Salmonella O 39	TR 1345	1
Анти-Salmonella O 40	TR 1346	1
Анти-Salmonella O 41	TR 1347	1
Анти-Salmonella O 42	TR 1348	1
Анти-Salmonella O 43	TR 1349	1
Анти-Salmonella O 44	TR 1350	1
Анти-Salmonella O 45	TR 1351	1
Анти-Salmonella O 46	TR 1315	1
Анти-Salmonella O 47	TR 1353	1
Анти-Salmonella O 48	TR 1354	1
Анти-Salmonella O 50	TR 1355	1
Анти-Salmonella O 51	TR 1356	1
Анти-Salmonella O 52	TR 1357	1
Анти-Salmonella O 53	TR 1358	1
Анти-Salmonella O 54	TR 1359	1
Анти-Salmonella O 55	TR 1360	1
Анти-Salmonella O 56	TR 1361	1
Анти-Salmonella O 57	TR 1362	1
Анти-Salmonella O 58	TR 1363	1
Анти-Salmonella O 59	TR 1364	1
Анти-Salmonella O 60	TR 1365	1
Анти-Salmonella O 61	TR 1366	1
Анти-Salmonella O 62	TR 1367	1
Анти-Salmonella O 63	TR 1368	1
Анти-Salmonella O 65	TR 1369	1
Анти-Salmonella O 66	TR 1370	1

1	2	3
Анти-Salmonella O 67	TR 1371	1
Анти-Salmonella Vi	TR 1316	1
Анти-Salmonella H a	TR 1401	1
Анти-Salmonella H b	TR 1402	1
Анти-Salmonella H c	TR 1403	1
Анти-Salmonella H d	TR 1404	1
Анти-Salmonella H e	TR 1405	1
	TR 5405	5
Анти-Salmonella H f	TR 1407	1
Анти-Salmonella H g	TR 1406	1
	TR 5406	5
Анти-Salmonella H g,m	TR 1408	1
	TR 5408	5
Анти-Salmonella H h	TR 1409	1
Анти-Salmonella H i	TR 1410	1
	TR 5410	5
Анти-Salmonella H k(I)	TS 1411	1
Анти-Salmonella HL	TR 1412	1
	TR 5412	5
Анти-Salmonella H m	TS 1413	1
Анти-Salmonella H n	TR 1438	1
Анти-Salmonella H p	TS 1414	1
Анти-Salmonella H q	TS 1415	1
Анти-Salmonella H r	TR 1416	1
Анти-Salmonella H s	TS 1417	1
Анти-Salmonella H t	TS 1418	1
Анти-Salmonella H u	TS 1419	1
Анти-Salmonella H v	TS 1420	1
Анти-Salmonella H w	TS 1421	1
Анти-Salmonella H x	TS 1422	1
Анти-Salmonella H y	TR 1423	1
Анти-Salmonella H z (I,II,III)	TR 1424	1
Анти-Salmonella H z _{4, 23}	TS 1425	1
Анти-Salmonella H z ₆	TS 1426	1
Анти-Salmonella H z ₁₀	TS 1427	1
Анти-Salmonella H z ₁₃	TR 1439	1
Анти-Salmonella H z ₁₅	TS 1428	1
Анти-Salmonella H z ₂₃	TR 1440	1
Анти-Salmonella H z ₂₄	TS 1429	1
Анти-Salmonella H z ₂₈	TS 1449	1
Анти-Salmonella H z ₂₉	TS 1430	1
Анти-Salmonella H z ₃₂	TS 1431	1
Анти-Salmonella H z ₃₅	TR 1445	1
Анти-Salmonella H z ₃₈	TR 1447	1
Анти-Salmonella H z ₄₁	TR 1448	1
Анти-Salmonella H 1	TR 1437	1
	TR 5437	5
Анти-Salmonella H 2	TS 1433	1
	TS 5433	5
Анти-Salmonella H 5	TS 1434	1
Анти-Salmonella H 6	TS 1435	1
Анти-Salmonella H 7	TS 1436	1

1	2	3
Антигены сальмонелл		
Salmonella Paratyphi A-O	TS 1606	10
Salmonella Paratyphi B-O	TS 1601	10
Salmonella Paratyphi C-O	TS 1607	10
Salmonella Typhi-O	TS 1602	10
Salmonella Paratyphi A-OH	TS 1613	10
Salmonella Paratyphi B-OH	TS 1614	10
Salmonella Paratyphi C-OH	TS 1615	10
Salmonella Typhi-OH	TS 1616	10
Salmonella Typhimurium-OH	TS 1611	10
Salmonella Enteritidis-OH	TS 1612	10
Salmonella Ha	TS 1631	10
Salmonella Hb	TS 1632	10
Salmonella Hc	TS 1633	10
Salmonella Hd	TS 1603	10
Позитивные контроли к антигенам сальмонелл		
Анти-Salmonella Paratyphi A	TS 1626	1
Анти-Salmonella Paratyphi B	TS 1604	1
Анти-Salmonella Paratyphi C	TS 1627	1
Анти-Salmonella Typhi	TS 1605	1
Анти-Salmonella Typhimurium	TS 1624	1
Анти-Salmonella Enteritidis	TS 1625	1
Анти-Salmonella Ha	TS 1641	1
Анти-Salmonella Hb	TS 1642	1
Анти-Salmonella Hc	TS 1643	1
Анти-Salmonella Hd	TS 1644	1

Примечание: * Для лиофилизированных реагентов приведен объем дистиллированной воды, который необходим для растворения реагента.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Сальмонеллы типировать в реакции агглютинации на предметных стеклах посредством эмульгирования 1-2 колоний чистой культуры тестируемых бактерий в капле необходимого реагента до получения мутной «молочной» суспензии. Энтероклоны и поликлональные антитела проявляют высокую специфичность, реагируя только с гомологичными им антигенами сальмонелл. Результаты теста учитывают визуально на темном фоне после смешивания реагентов с тестируемым изолятом сальмонелл: при отрицательной реакции смесь остается мутной («молочной»), при положительной реакции она просветляется, становится прозрачной и в ней появляются светлые агглютинаты.

4.2. Антигены сальмонелл S. Paratyphi A, B, C, S. Typhi, S. Typhimurium и S. Enteritidis позволяют выявлять антитела к соответствующим сероварам сальмонелл, что дает основание для постановки предварительного диагноза. Окончательный диагноз ставят на основании установления повышения титра этих антител (сероконверсии).

4.3. При проведении исследований расход энтероклонов и поликлональных антител составляет 1 мл/40 анализов, антигенов в рабочем разведении (1:10) — 1 мл/400 анализов (при проведении реакции агглютинации в пробирках) или 1 мл/2000 анализов (при постановке теста в микротитрационных планшетах).

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения реагентов — класс 2а.

5.2. Реагенты в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. Реагенты не содержат живых микроорганизмов и их генетического материала, а также клеточных элементов гибридом, и поэтому не требуют соблюдения особых мер предосторожности при работе с ними.

5.4. Меры предосторожности — соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.5. При работе с РДС Sifin следует пользоваться одноразовыми резиновыми или пластиковыми перчатками для защиты от исследуемых материалов (культур сальмонелл и сыворотки крови пациентов), которые являются потенциально инфицированными.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С РЕАГЕНТАМИ:

Для проведения типирования сальмонелл в реакции агглютинации на стекле требуются:

- стекла предметные микроскопические (можно с лункой);
- петли пластиковые бактериологические стерильные;
- пластиковые пастеровские пипетки;
- палочки стеклянные;
- стерильная дистиллированная вода (для растворения лиофилизированных реагентов)
- емкость для сбора отходов.
- перчатки резиновые или пластиковые.

Для выявления специфических агглютинирующих антител в тесте Видаля требуются:

- пробирки агглютинационные;
- микротитрационные планшеты;
- петли пластиковые бактериологические стерильные;
- пластиковые пастеровские пипетки;
- пипетки полуавтоматические одноканальные на 50-500 мкл со сменными наконечниками;
- физиологический раствор (0,9 % NaCl);
- лупа с 6-кратным увеличением.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

С помощью РДС Sifin можно типировать чистые культуры сальмонелл, выделенных из различных источников (от людей, животных, из пищевых продуктов, с объектов окружающей среды).

Для серологической диагностики сальмонеллеза исследуют сыворотку крови, взятую у пациентов однократно (для предварительной постановки диагноза) или с интервалом в 4-10 дней (для окончательной постановки диагноза).

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗОВ И УЧЕТ ИХ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Типирование сальмонелл

Реакцию агглютинации проводят на предметном стекле в следующей последовательности:

- с омнивалентным энтероклоном Анти-Salmonella (A – 67). Все референтные штаммы сальмонелл должны дать положительную реакцию;
- с поливалентным энтероклоном Анти-Salmonella I (A – E). Сальмонеллы, относящиеся к серогруппам A – E, должны дать положительную реакцию, а сальмонеллы редко встречающейся серогруппы F — отрицательную реакцию;
- при получении отрицательной реакции с энтероклоном Анти-Salmonella I (A – E) культуру исследуют поливалентным энтероклоном Анти-Salmonella II (F). Сальмонеллы, относящиеся к серогруппе F должны дать положительную реакцию;
- культуры, отнесенные к серогруппам A—E, тестируют группоспецифическими энтероклонами до получения положительного результата в следующей последовательности: Анти-Salmonella групп D, B, C, E и A;
- тестируют культуру моноспецифическими энтероклонами и поликлональными антителами к антигенам H сальмонелл.

Подробная информация по проведению типирования сальмонелл приведена ниже (пп. 8.1.1—8.1.5; таблицы 2—5).

8.1.1. Тестирование омнивалентным энтероклоном Анти-Salmonella (A – 67) позволяет определить, относится ли изолят бактерии к роду *Salmonella* (положительная реакция). Такую проверку проводят при отсутствии возможности оценки его биохимической активности. Отрицательная реакция с этим реагентом свидетельствует о том, что изолят бактерии не относится к роду *Salmonella* или является *S. Typhi*, *S. Dublin* или *S. Paratyphi C*, у которых реактивность О-антигенов маскирует антиген Vi. Для инактивации последнего культуру кипятят на водяной бане в течение 30 мин и повторно тестируют энтероклоном Анти-Salmonella (A – 67). Повторное получение отрицательной реакции свидетельствует о том, что изолят не является сальмонеллой, а положительная реакция — о том, что он относится к одному из 3 упомянутых выше сероваров сальмонелл.

8.1.2. С помощью поливалентных энтероклонов Anti-Salmonella I (A – E) и Anti-Salmonella II (F-67) дифференцируют редко встречающуюся серогруппу F от остальных серогрупп сальмонелл (таблица 2).

Таблица 2. Подтверждение принадлежности к изолята к роду *Salmonella* и дифференцировка серогруппы F от остальных серогрупп

Энтероклоны	Агглютинация		
	Сальмонелла группы A—E	Сальмонелла группы F	Бактерии других родов
Омнивалентный Анти-Salmonella (A – 67)	+	+	—
Поливалентный Anti-Salmonella I (A – E)	+	—	ни
Поливалентный Anti-Salmonella II (F-67)	—	+	ни

Обозначения. + положительная реакция; — отрицательная реакция; ни — не исследуют

8.1.3. Тестирование группоспецифическими энтероклонами (таблица 3) позволяет определить, к какой серогруппе относится изолят, и выбрать оптимальную схему определения его антигенной формулы. Реагенты применяют в следующей последовательности, соответствующей частоте распространения серогрупп сальмонелл: Анти-Salmonella групп D, B, C, E, A.

Таблица 3. Схема определения серогрупповой принадлежности сальмонелл

Энтероклоны	Агглютинация				
	Группа D	Группа B	Группа C	Группа E	Группа A
Анти-Salmonella группа D	+	—	—	—	—
Анти-Salmonella группа B	ни	+	—	—	—
Анти-Salmonella группа C	ни	ни	+	—	—
Анти-Salmonella группа E	ни	ни	ни	+	—
Анти-Salmonella группа A	ни	ни	ни	ни	+

Обозначения: + положительная реакция; — отрицательная реакция; ни — не исследуют

8.1.4. Тестирование моноспецифическими энтероклонами к антигенам O является одним из основных этапов составления антигенной формулы сальмонелл. Выбор необходимых для этого реагентов определяется результатами предыдущего этапа типирования на основании данных, приведенных в таблице 4.

Таблица 4. Схема выбора энтероклонов к соматическим антигенам (O) сальмонелл

Группа	Антигены O общие для всех сероваров группы*	Возможные комбинации специфических антигенов O**	Примечание
1	2	3	4
A	2	1***, 2, 12; 2, 12	При наличии O1 не определяют O12
B	4, 5, 27	4, 12; 1, 4, 12; 4, 5, 12; 1, 4, 5, 12; 4, 12, 27; 1, 4, 12, 27	
C1-C3	7, 8 (C1); 8 (C2-C3)	6, 7; 6, 7, Vi; 6, 7, 14; 6, 8; 8; 8, 20	Для групп C2-C3 обязательна проверка на наличие O6 _i и O20. Если этих антигенов не, то штамм имеет O8.
D1-D3	9 (D), 46 (D2)	9, 12; 9, 12, Vi; 1, 9, 12; Очень редко: 9, 46, 1, 9, 12, 46, 27	Выявлению O9 может мешать Vi. Энтероклон к O46 выявляет все штаммы D2, слабо реагирует или не реагирует с D3 и не реагирует с D1. D3 окончательно идентифицируют по O9 и O27.
E1, E4	3 (E1, E4), 34 (E1), 10 (E1 неконвертированные фагами ε15, ε15 и ε34 штаммы), 15 (E1 конвертированные фагами ε15, ε15 и ε34 штаммы), 19 (E4), 34 (E1 конвертированные фагами ε15 и ε34 штаммы)	3, 10; 3, 15, 3, 15, 34, 1, 3, 19. Очень редко: 1, 3, 10, 19 и 1, 3, 15, 19	Энтероклон к O10 не реагирует со штаммами E1 после конверсии фагами и с частью штаммов E4. Энтероклон к O15 не реагирует со штаммами E1 и частью штаммов E4. Энтероклон к O34 не реагирует со штаммами E4 и штаммами, имеющими антигены 3, 10 или 3, 15; он не реагирует с O12 _i и O28, поэтому позволяет дифференцировать штаммы в группе E1.

Примечания. * По наличию у сальмонеллы антигенов, перечисленных в данной колонке, устанавливают ее групповую принадлежность;

** Обнаружение антигенов, перечисленных в данной колонке, позволяет составить антигенную формулу.

***Подчеркнуты обозначения антигенов, появляющихся только после фаговой конверсии.

8.1.5. Типирование сальмонелл завершается анализом наличия у них жгутиковых (H) антигенов обеих фаз. Типировать H-антигены первой фазы можно у колоний, полученных с низкоселективной агаровой среды. Вторую фазу этих антигенов индуцируют методом ингибирования роста по Гарду в следующей модификации. В центр чашки Петри (диаметром 6 см) с 10 мл полужидкой (0,8-1%) агаровой среды наносят 0,1 мл энтероклона или поликлональных антител, соответствующих выделенной фазе антигена H (перечень реагентов панели, которыми пользуются для этого, приведен в таблице 5). Энтероклоны Anti-Salmonella H E, H g, H L и H I пригодны для фазовой индукции всех возможных комбинаций антигенов H. Энтероклон Anti-Salmonella H I способен ингибировать антигены H 1, 2; 1, 5; 1, 6 и 1, 7. Выбранный реагент распределяют стерильным шпателем по поверхности среды. В центр чашки Петри после подсыхания реагента вносят культуру исследуемого изолята. Посев инкубируют при температуре 37 °C в течение 16-20 ч. Если изолят распространился по поверхности среды, то проводят идентификацию реагентами второй фазы антигена H. В противном случае считают, что культура сальмонелл имеет только 1 фазу антигена H.

Таблица 5. Реагенты, применяемые для определения жгутиковых антигенов (H) сальмонелл

Реагенты	Выявляемые антигены	Пригодность для фазовой индукции
1	2	3
Энтероклон Анти-Salmonella H a	H a	+
Энтероклон Анти-Salmonella H b	H b	+
Энтероклон Анти-Salmonella H c	H c	+
Энтероклон Анти-Salmonella H d	H d	+
Энтероклон Анти-Salmonella H E	H e,h; e,n,x; e,n,z ₁₅ ; e,n,x,z ₁₅	+
Энтероклон Анти-Salmonella H f	H f,g; f,g,s; f,g,t	+
Энтероклон Анти-Salmonella H g	Все комбинации антигенов комплекса H g, за исключением H m,t	+
Энтероклон Анти-Salmonella H g,m	Все комбинации антигенов комплекса H g, включая H m,t	+
Энтероклон Анти-Salmonella H h	H e,h	—
Энтероклон Анти-Salmonella H i	H i	+
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H k(I)	H k (I)	+
Энтероклон Анти-Salmonella H L	H l,v; H l,w; H l,z ₁₃ ; H l,z ₂₈ ; H l,z ₁₃ ,z ₂₈	+
Поликлональные антитела Анти-Salmonella 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	—
Энтероклон Анти-Salmonella H n	H e,n,x; e,n,z ₁₅ ; e,n,x,z ₁₅	+
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H p	H g,m,p,s; g,p; g,p,s; g,p,u; m,p,t,u	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H q	H g,q; g,m,q	—
Энтероклон Анти-Salmonella H r	H r	+
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H s	H f,g,s; g,m,s; g,m,s,t; g,p,s; g,s,t	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H t	H m,t; f,g,t; g,m,t; g,m,s,t; g,t; g,s,t; m,p,t,u	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H u	H g,p,u; m,p,t,u	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H v	H l,v	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H w	H l,w	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H x	H e,n,x; e,n,x,z ₁₅	—
Энтероклон Анти-Salmonella H y	H y	+
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H z (I,II,III)	H z (I, II, III)	+
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H z ₄ , z ₂₃	H z ₄ ,z ₂₃ ; z ₄ ,z ₂₄ ; z ₄ ,z ₃₂ ; z ₄ ,z ₂₃ ,z ₃₂	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H z ₆	H z ₆	—
Энтероклон H z ₁₀	H z ₁₀	+
Энтероклон H z ₁₃	H z ₁₃	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H z ₁₅	H e,n,z ₁₅ ; e,n,x,z ₁₅	—
Энтероклон Анти-Salmonella H z ₂₃	H z ₂₃	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H z ₂₄	H z ₄ ,z ₂₄	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H z ₂₈	H z ₂₈	—
Поликлональные антитела H z ₂₉	H z ₂₉	—
Поликлональные антитела H z ₃₂	H z ₄ ,z ₃₂	—
Энтероклон Анти-Salmonella H z ₃₅	H z ₃₅	+

1	2	3
Энтероклон Анти-Salmonella H z ₃₈	H z ₃₈	+
Энтероклон Анти-Salmonella H z ₄₁	H z ₄₁	+
Энтероклон Анти-Salmonella H 1	H 1,2; 1,5; 1,6; 1,7; 1,2,7; 1,5,7	+
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H 2	H 1,2	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H 5	H 1,5	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H 6	H 1,6	—
Поликлональные антитела Анти-Salmonella H 7	H 1,7	—

8.1.6. Методика проведения реакции агглютинации при типировании сальмонелл

Выявление антигенов у изолятов сальмонелл проводят в реакции агглютинации на предметном стекле. Реагенты, поставляемые в жидкой форме, полностью готовы к использованию. Лиофилизированные реагенты перед использованием разводят стерильной дистиллированной водой до конечного объема, указанного на флаконе.

Реакцию проводят по следующей схеме:

1. Наносят 1 каплю реагента определенной специфичности на предметное стекло.
2. Снимают стерильной бактериологической петлей с низкоселективной плотной питательной среды 1-2 колонии сальмонелл и суспендируют их в капле реагента стеклянной палочкой (для ускорения реакции стекла можно покачивать до 20 раз).
3. Для исключения спонтанной агглютинации ставят негативный контроль с физиологическим или фосфатно-буферным раствором вместо тестируемых колоний бактерий.
4. Визуально учитывают результаты на темном фоне. При положительной реакции, свидетельствующей о присутствии соответствующего антигена у исследуемой бактерии, смесь полностью просветляется (становится прозрачной), в ней появляются светлые плотные агглютинаты. При отрицательной реакции, свидетельствующей об отсутствии соответствующего антигена у исследуемой бактерии, смесь остается непрозрачной (молочно-мутной).

На основании полученных результатов подтверждают принадлежность изолята бактерии к роду *Salmonella* и составляют его антигенную формулу, в которой последовательно указывают условные обозначения соматических антигенов O и жгутиковых антигенов H. С помощью составленной антигенной формулы определяют серотип сальмонеллы. Например, если составлена антигенная формула 1,4,[5],12:i:1,2, то культуру идентифицируют как *Salmonella Typhimurium*.

8.2. Серологическая диагностика сальмонеллеза

Тест Видаль позволяет выявлять в сыворотке крови пациентов агглютинирующие антитела к *S. Paratyphi A, B, C, S. Typhi, S. Typhimurium, S. Enteritidis*, а также определять титр этих антител. Его проводят в пробирках (со всеми антигенами сальмонелл) или в микротитрационных планшетах с U-образным дном (с O и OH антигенами).

Для разведения реагентов при проведении теста пользуются физиологическим раствором. Анализируемую сыворотку крови предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении 1:25 (например, посредством смешивания 50 мкл сыворотки крови с 1,2 мл физиологического раствора). Антигены разбавляют тем же раствором в соотношении 1:10.

А. Проведение теста в агглютинационных пробирках.

1. Для каждого антигена сальмонелл используют по 6 пробирок в каждом ряду штатива, в которые вносят по 0,5 мл физиологического раствора.
2. Затем в первую пробирку добавляют равный объем рабочего разведения (1:25) исследуемой сыворотки крови.
3. После тщательного перемешивания из первой пробирки переносят во вторую 0,5 мл содержимого — данную процедуру повторяют до тех пор, пока не дойдут до шестой пробирки, из которой 0,5 мл содержимого после перемешивания удаляют.
4. Антигены сальмонелл разводят физиологическим раствором 1:10 (рабочее разведение).
5. Вносят рабочее разведение каждого из антигенов сальмонелл в соответствующий ряд пробирок.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешивают.

7. Закрывают пробирки пробками и помещают штативы с ними в водяную баню. Пробирки с антигенами О и ОН сальмонелл инкубируют при температуре 50°C в течение 16-20 ч, а пробирки с антигенами Н сальмонелл при температуре 37 °C в течение 4 ч.

Б. Проведение теста в микротитрационных планшетах

1. Вносят в 6 лунок (А—F) каждого ряда планшета по 50 мкл физиологического раствора.
2. В первую лунку (А) каждого ряда добавляют 50 мкл рабочего разведения (1:25) тестируемой сыворотки крови.
3. Далее поступают так же, как при постановке теста в пробирках, с той лишь разницей, что из лунки в лунку переносят не по 0,5 мл, а по 50 мкл реагентов (в таком объеме в лунки вносят и рабочее разведение сальмонеллезных антигенов). После смешивания в лунках реагентов планшеты закрывают крышками или пленкой.

8.2.1. Контроли.

Оба варианта теста Видала проводят со следующими контролями:

- Рабочее разведение сальмонеллезных антигенов (1:10) смешивают с равным объемом фосфатно-буферного раствора и инкубируют пробирки в каждом из приведенных выше температурных режимах.
- Смешивают разведение тестируемой сыворотки (1:25) с равным объемом (0,5 мл) физиологического или фосфатно-буферного раствора.
- Серийные разведения позитивных контролей антигенов (1:25), приготовленных тем же способом, каким готовили серийные разведения тестируемой сыворотки, смешивают в отдельных пробирках с равным объемом (0,5 мл) рабочего разведения сальмонеллезных антигенов. Инкубируют пробирки в приведенных выше температурных режимах.

8.2.2. Учет результатов.

8.2.2.1. *При проведении теста в агглютинационных пробирках:* по окончании инкубации пробирки слегка встряхивают (при этом принимают во внимание, что агглютинаты антигенов Н сальмонелл легко разрушаются) и учитывают результаты реакции визуально (с помощью агглютиноскопа или лупы с 6-кратным увеличением) на темном фоне.

Реакцию считают положительной, если обнаруживают отчетливо видимые агглютинаты: гранулярные при тестировании сальмонеллезных О-антигенов и крупно-хлопчатые при тестировании Н-антигенов.

Реакцию считают отрицательной, если реакционная смесь сохраняет вид непрозрачной и мутной жидкости.

8.2.2.2. *При проведении теста в микротитрационных планшетах:* по окончании инкубации учитывают результаты, рассматривая содержимое лунок планшетов на темном фоне невооруженным глазом.

Реакцию считают положительной, если в лунках образовались пленчатые или пуговчатые агглютинаты (последние лежат на дне лунок и не исчезают и не меняют форму при покачивании планшета).

Реакцию считают отрицательной, если антигены преципитировали на дно лунок в виде пуговицы, которая исчезает или по форме становится похожей на язык при покачивании планшета.

8.2.2.3. Титром специфических антител исследованной сыворотки считают максимальное ее разведение, давшее положительную реакцию. Выявление у пациента сывороточных антител в титре 1:100 и выше служит основанием для подозрения на сальмонеллезную инфекцию. Установление увеличения титра специфических антител (сероконверсии) при исследовании в тесте Видала повторно взятой у пациента через 14 дней сыворотки крови, служит основанием для постановки окончательного диагноза.

8.2.2.4. Результаты теста считают достоверными, если в контролях отсутствуют признаки спонтанной агглютинации антигенов сальмонелл и тестируемой сыворотки, а позитивные контроли антигенов дали положительную реакцию только с гомологичными сальмонеллезными антигенами в разведениях, соответствующих их титру, указанному на этикетках флаконов.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

9.1. РДС Sifin должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в сухом месте в течение срока годности. Замораживание реагентов не допускается.

9.2. Срок годности реагентов разной специфичности и формы выпуска (жидкие или лиофилизированные) варьирует от 1,5 до 5 лет. Дата его истечения указана на этикетках флаконов с реагентами.

9.3. Лيوфилизированные реагенты перед применением следует растворить дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетках флаконов. Дата истечения срока использования растворенных реагентов указана на этикетке флакона.

9.4. Во время работы флаконы с реагентами рекомендуется держать закрытыми (исключая момент взятия из них реагентов), а по окончании работы плотно закрыть крышками и хранить при температуре 2-8 °С.

9.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей Инструкции.

По вопросам, касающимся качества реагентов РДС Sifin, следует обращаться в:

- ООО «ГЕМ» по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4а. Тел./факс: 8(495) 612-43-12; 612-40-81;

- Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, г. Москва, Научный проезд, д.14а, тел.: (499) 120-60-95; 120-60-96

