

Table 3. – Identification of *Salmonella* H using *Salmonella* H Antisera Spicer-Edwards.

H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards			
	1	2	3	4		1	2	3	4
a	+	+	+	–	k	–	+	+	+
b	+	+	–	+	r	–	+	–	+
c	+	+	–	–	y	–	+	–	–
d	+	–	+	+	z	–	–	+	+
e,h	+	–	+	–	Z ₄ Complex**	–	–	+	–
G Complex*	+	–	–	+	Z ₁₀	–	–	–	+
i	+	–	–	–	Z ₂₉	–	+	+	–

*The G complex component of Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1 and 4 reacts with antigens f,g; f,g,s; f,g,t; g,m; g,m,s; g,m,s,t; g,m,t; g,p; g,p,s; g,p,u; g,q; g,s,t; g,t; m,p,t,u and m,t.

**The Z₄ Complex component reacts with Z₄,Z₂₃; Z₄,Z₂₄ and Z₄,Z₃₂.

Note that no antigen is positive with all four Salmonella H Antisera Spicer-Edwards. Any antigen that reacts with all four sera should be checked for smoothness.

Slide Test Procedure

Salmonella O and Vi Antisera

Use this procedure to test the isolate with each selected antiserum.

- Dispense 1 drop (35 µL) of each antiserum to be tested on an agglutination slide.
- From a solid agar medium, transfer a portion of a loopful of an isolated colony to the reaction area above and mix thoroughly.
- Negative control:** Dispense 1 drop of 0.85% sterile NaCl solution on an agglutination slide. Add 1 drop of each **Difco** Salmonella O Antiserum to be tested on an agglutination slide and mix thoroughly.
- Positive control:** Dispense 1 drop of each **Difco** Salmonella O Antiserum to be tested on an agglutination slide. Add 1 drop of an appropriate **Difco** QC Antigen Salmonella or stock cultures of known serological identification.
- Rotate the slides for 1 min and read for agglutination. Results must be read within 1 min.

Tube Test Preparation

- 0.6% Formalized Saline:** Prepare by adding 6 mL formaldehyde per 1000 mL of sterile 0.85% NaCl solution.
- Test organism:** It is often necessary to increase the motility of the test organism. To accomplish this, make several consecutive transfers in Motility GI Medium.
 - Inoculate the tube slightly below the surface of the medium using the stab method.
 - Incubate at 35-37°C for 18-20 h.
 - Transfer only those organisms that have migrated to the bottom of the tube.
 - When the organism successfully travels 50-60 mm through the medium in 18-20 h, it is ready for use.
 - An infusion broth such as Veal Infusion Broth is recommended for cultivating motile *Salmonella* prior to testing. It should be inoculated and incubated at 35°C for 24 h. Brain Heart Infusion Broth may be used with incubation at 35°C for 4-6 h. If Tryptic Soy Broth is used, incubate at 35°C for 24 h.
 - Prepare the test organism suspension by using equal volumes of broth culture and 0.6% formalized saline. The final density of this test suspension should be that of a McFarland Turbidity Standard No. 3.
- Positive control:** Commercially prepared QC Salmonella H antigens are not available. The user must maintain stock cultures of known serological identification for use in quality control. Prepare the antigen by using known serotypes and following the procedure described above. (See **Test organism**, above.)
- Salmonella H Antisera:** Reconstituted antisera are considered a 1:2 working dilution. Prepare dilutions as follows and use on the day prepared. Discard any unused portion.
 - Most **Salmonella H Antisera:** Prepare a 1:250 dilution by adding 0.1 mL reconstituted antiserum to 25 mL of 0.85% NaCl solution. After mixing equal amounts (0.5 mL) of diluted antiserum and test isolate, the final dilution is 1:1,000.
 - Salmonella H Antisera x, z₁₃, z₁₅ and z₂₆:** Prepare a 1:125 dilution by adding 0.1 mL reconstituted antiserum to 12.5 mL of 0.85% NaCl solution. After mixing equal amounts (0.5 mL) of diluted antiserum and test isolate, the final dilution is 1:500.
 - Salmonella H Antiserum Poly a-z:** Prepare a 1:25 dilution by adding 0.1 mL reconstituted antiserum to 2.5 mL of 0.85% NaCl solution. After mixing equal amounts (0.5 mL) of diluted antiserum and test isolate, the final dilution is 1:100.

Tube Test Procedure

Salmonella H Antisera

- Prepare a 12 x 75 mm culture tube for each organism to be tested.
- Diluted antiserum:** Dispense 0.5 mL in each tube.
- Test isolate:** Add 0.5 mL to the appropriate tube.
- Positive control:** Add 0.5 mL of antigen positive control to a tube containing 0.5 mL of antiserum.
- Negative control:** Add 0.5 mL of 0.85% NaCl solution to a tube containing 0.5 mL of test isolate.
- Incubate all tubes in a water bath at 50 ± 2°C for 1 h.
- Read for flocculation (agglutination).
- Repeat the Tube Test using a phase-reversed test organism. (See the procedure for **Phase Reversal** below.)

Phase Reversal

- Prepare Motility GI Medium phase reversal medium according to directions.
- Prepare the antiserum opposite to the phase desired. For example, incubating *Salmonella* Typhimurium phase 1[i] in GI Motility Medium containing i antiserum allows growth and spread of *S. Typhimurium* phase 2 [1,2].
- Add 1 mL of a 1:10 dilution of antiserum to 25 mL of sterile GI Motility Medium and mix well. Pour into a sterile Petri dish and allow to solidify.
- Inoculate by punching the edge of the solidified medium.
- Incubate at 35-37°C for 24 h.
- Transfer growth from the spreading edge opposite the inoculation site to a liquid medium for testing according to steps under **Tube Test Procedure – Salmonella H Antisera**.
- If motility is not acceptable, pass through Motility GI Medium again.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards

- Prepare the test organism and the 1:2 antiserum dilution as described above in **Tube Test Preparation**.
- Final 1:1,000 dilution of antiserum:** Prepare by adding 0.1 mL of reconstituted antiserum (1:2 working dilution) to 25 mL of 0.85% NaCl solution.
- Prepare 4 culture tubes (12 x 75 mm) for each test organism.
- Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1-4:** Add 0.5 mL of the diluted antiserum to the culture tubes.
- Test organism:** Add 0.5 mL to each tube.
- Incubate tubes in water bath at 50 ± 2°C for 1 h.
- Remove from the water bath. Avoid excessive shaking when the tubes are in the water bath or when removing them from the water bath prior to reading the reactions.
- Read for flocculation (agglutination).

User Quality Control: At the time of use, apply both homologous and heterologous controls to check performance of the antiserum, techniques and methodology. **Difco** QC Antigens Salmonella may be used as a homologous control. Refer to the **Difco** QC Antigens Salmonella package insert for further instructions.

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent NCCLS guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

RESULTS

Slide Test

- Read and record results as follows:

4+	100% agglutination, background is clear to slightly hazy.	1+	25% agglutination, background is cloudy.
–	75% agglutination, background is slightly cloudy.	–	No agglutination.
2+	50% agglutination, background is moderately cloudy.		

- The positive control should show 3+ or greater agglutination.
- The negative control should show no agglutination.
- For test isolates, a 3+ or greater agglutination is a positive result.
- A partial (less than 3+) or delayed agglutination reaction should be considered negative.
- If an H antigen identification is required, proceed to the next section.

Tube Test

- Read and record results as follows:

4+	100% agglutination; background is clear to slightly hazy.	1+	25% agglutination; background is cloudy.
3+	75% agglutination; background is slightly cloudy.	–	No agglutination
2+	50% agglutination; background is moderately cloudy.		

- The positive control should show 3+ or greater agglutination at the routine test dilution (RTD).
- The negative control should show no agglutination.

When using **Difco** Salmonella H Spicer-Edwards, compare results with the flocculation (agglutination) patterns for the Spicer-Edwards schema (See Table 3, above).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Complete O and H antigen characterization of a *Salmonella* isolate is required for final identification. Due to the complexity of the laboratory procedures, identification with polyvalent antisera may be sufficient for most laboratories.
- Possible *Salmonella* isolates having inconsistencies in biochemical reactions and O and H antigen tests should be referred to a reference laboratory for further testing.
- Excessive heat from external sources (hot bacteriological loop, burner flame, light source, etc.) may prevent making a smooth suspension of the microorganism or cause evaporation or precipitation of the test mixture. False-positive reactions may occur.
- Rough culture isolates do occur and will agglutinate spontaneously, causing agglutination of the negative control reaction (autoagglutination). Smooth colonies must be selected and tested in serological procedures.
- In the slide agglutination procedure for O antigen testing, it is recommended that several colonies be tested and that unabsorbed polyvalent antisera be used followed by absorbed single factor antisera. For example, colonies of a 1,2,12 culture on an agar plate will have varying degrees of each antigen. A 1,2,12 antiserum absorbed of 1 and 12 antibodies will be highly specific but will show weak or no agglutination with colonies that have less of antigen 2 and more of antigens 1 and 12. Using unabsorbed **Difco** Salmonella O Antiserum Group A Factors 1,2,12 to test several suspicious colonies on a plate followed by testing with absorbed **Difco** Salmonella O Antiserum Factor 2 gives the needed balance of sensitivity and specificity.
- Agglutination reactions of 3+ or greater are interpreted as positive reactions. Cross-reactions resulting in a 1+ or 2+ agglutination are likely since there are somatic antigens shared among different groups as non-major group antigens.
- There may exist common antigens between various "O" serogroups of *Salmonella*. As an example, **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A contains, among others, agglutinins for factor 1, since cultures possessing factor 1 were used in immunization. It may be expected that this polyvalent antiserum will react with cultures other than those contained in "O" serogroups A, B, D, E and L due to the common 1 antigen (those organisms in Group G₁, G₂, H, R, T, etc., which contain factor 1).
- Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi has been prepared with representative members of those somatic groups and has not been absorbed. It is obvious that this serum may and will react with higher O groups of *Salmonella*.
- The tube agglutination technique is recommended for H antigen testing because cross-reactions with somatic antigens may occur at the dilutions used in the slide technique.
- In the tube test, make certain that the proper dilution is prepared for a given antiserum. Various dilutions are used for various antisera. Refer to the **Tube Test Preparation** section for details.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Salmonella O Antisera and Salmonella Antiserum Vi: Sensitivity of **Difco** Salmonella O Antisera and Salmonella Antiserum Vi are determined by demonstrating appropriate reactivity, as defined in the Results, Slide Test section, against a battery of homologous *Salmonella* cultures (See Table 4, page 10). Specificity is determined by demonstrating non-reactivity against non-related (heterologous) *Salmonella* groups.

Salmonella H Antisera

Sensitivity of **Difco** Salmonella H Antisera is determined by demonstrating appropriate reactivity, as defined in the Results, Tube Test section, against a battery of homologous *Salmonella* cultures (See Table 5, page 11). Specificity is determined by demonstrating non-reactivity against non-related (heterologous) *Salmonella* groups.

AVAILABILITY: See page 12.

REFERENCES

- McWhorter-Murlin, A.C., and F.W. Hickman-Brenner. 1994. Identification and serotyping of *Salmonella* and an update of the Kauffmann-White Scheme. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- Popoff, M.Y., and L. LeMinor. 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Old, D.C. 1992. Nomenclature of *Salmonella*. J. Med. Microbiol. 37:361-363.
- Penner, J.L. 1988. International committee on systematic bacteriology taxonomic subcommittee on *Enterobacteriaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:223-224.
- LeMinor, L., and M.Y. Popoff. 1987. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:465-468.
- Wayne, L.G. 1991. Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:185-187.
- Wayne, L.G. 1994. Actions of the Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology on requests for opinions published between January 1985 and July 1993. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:177.
- Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y.
- Farmer III, J.J., A.C. McWhorter, D.J. Brenner and G.D. Morris. 1984. The *Salmonella-Arizona* group of *Enterobacteriaceae*: nomenclature, classification and reporting. Clin. Microbiol. Newsl. 6:63-66.
- Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover. 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Isenberg, H.D. (ed.). 1992. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- AOAC International. 2001. FDA bacteriological analytical manual online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mm.html>.
- Andrews, W.H., R.S. Flowers, J. Silliker and J.S. Bailey 2001. *Salmonella*. In F.P. Downes and K. Ito (ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

BD Difco Salmonella O Antisera Difco Salmonella H Antisera Difco Salmonella Antiserum Vi

Français

APPLICATION

Les **Difco** Salmonella O Antisera (sérum anti-Salmonella O Difco) s'utilisent dans des tests d'agglutination sur lame pour l'identification des *Salmonella* par des antigènes somatiques (O).

Les **Difco** Salmonella H Antisera (sérum anti-Salmonella H Difco) s'utilisent dans des tests d'agglutination en tube pour l'identification des *Salmonella* par des antigènes flagellaires (H).

Le **Difco** Salmonella Vi Antiserum (sérum Vi anti-salmonella Difco) s'utilise dans des tests d'agglutination sur lame pour l'identification de la *Salmonella* Vi.

RESUME ET EXPLICATION

Les espèces de *Salmonella* sont responsables de diverses maladies humaines appelées salmonellose. Le degré de maladie varie entre une gastro-entérite légère et des formes plus graves, éventuellement avec septicémie ou fièvre typhoïde, ce qui peut être dangereux. Trois sérotypes de *S. enterica* subsp. *enterica* sont principalement associés à une maladie grave et une septicémie (Choleraesuis, Paratyphi A et Typhi), bien que la plupart des plus de 2300 souches autres soient associées à la gastro-entérite. La sévérité de la maladie diarrhéique dépend de la virulence de la souche et de l'état de l'hôte humain. La *Salmonella* se trouve dans la nature et se rencontre dans le tube digestif de nombreux animaux, à la fois sauvages et domestiques. Les microorganismes peuvent se transmettre à l'homme par contact avec l'environnement et par la consommation de viande ou de légumes.

Tous les sérotypes de *Salmonella* appartiennent aux deux espèces : *S. bongori*, qui contient 18 sérotypes et *S. enterica*, qui contient plus de 2300 sérotypes restants, divisés parmi six sous-espèces.^{1,2}

Les six sous-espèces de *S. enterica* sont :

<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I ou 1)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa or 3a)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV ou 4)
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II ou 2)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb or 3b)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI ou 6)

La nomenclature et la classification de ces bactéries changent constamment³. Les *Salmonella* et les *Arizona* doivent être considérées comme un genre unique, *Salmonella*.⁴ Il est recommandé aux laboratoires de rapporter les noms des sérotypes de *Salmonella* pour les sous-espèces d'*enterica*. Le nom des sérotypes n'est plus en italique et la première lettre prend une majuscule. Par exemple, la souche qui était identifiée comme *Salmonella typhimurium* est maintenant connue comme *Salmonella* Typhimurium.

Les sérotypes d'autres sous-espèces de *S. enterica* (sauf certains dans les sous-espèces *salamae* et *houtenae*) et ceux de *S. bongori* ne sont pas dénommés et sont désignés par leur formule antigénique. Pour obtenir les informations les plus récentes sur la nomenclature, consulter les références appropriées.¹⁻¹⁰

PRINCIPES DE LA METHODE

Les antigènes de *Salmonella* O sont des antigènes somatiques (O) thermostables et sont identifiés en premier. L'antigène Vi est un antigène d'enveloppe thermolabile qui peut entourer une paroi cellulaire et masquer l'activité d'un antigène somatique. Les microorganismes ayant l'antigène Vi ne provoqueront pas d'agglutination dans les antisérums O. Afin de déterminer l'antigène O de ces cultures, une suspension du microorganisme doit être portée à ébullition pour détruire l'antigène d'enveloppe thermolabile et doit ensuite être testée avec les antisérums O. Les antigènes flagellaires (H) sont thermolabiles et sont généralement associés à la motilité.

La caractérisation complète sérologique de la *Salmonella* n'est pas nécessaire à une détection réussie du microorganisme lorsqu'elle se présente comme un pathogène. L'utilisation de procédures d'isolement adéquates et de tests biochimiques différentiels est de première importance. Les isolats de *Salmonella* éventuels peuvent être identifiés de façon présomptive avec un minimum d'identification sérologique. Les isolats peuvent être envoyés dans des laboratoires pratiquant le niveau de test nécessaire pour identifier complètement les microorganismes.

Pour une plus ample discussion sur l'identification sérologique de la *Salmonella*, consulter les références appropriées.^{1-3,9,11-14}

L'identification des espèces de *Salmonella* comprend à la fois l'identification biochimique et sérologique. La confirmation sérologique implique une procédure dans laquelle le microorganisme (un antigène) réagit avec l'anticorps correspondant. Cette réaction *in vitro* entraîne une formation d'agréats macroscopiques appelée agglutination. La réaction homologue souhaitée est rapide, ne dissocie pas (avidité élevée) et lie fermement (affinité élevée).

Des réactions hétérologues sont possibles car un microorganisme (antigène) peut agglutiner un anticorps produit en réponse à d'autres espèces bactériennes. Ils se caractérisent par une concentration faible et de formation lente. Ces réactions inattendues et, peut-être, imprévues peuvent conduire à une certaine confusion d'identification sérologique. Ainsi, une réaction d'agglutination homologue positive doit concorder avec l'identification du microorganisme sur la base de ses caractéristiques biochimiques et morphologiques.

L'agglutination de l'antigène somatique dans la lame de test apparaît comme un agrégat granuleux ferme. Les réactions homologues sont rapides et élevées (3+). Les réactions hétérologues sont lentes et faibles.

L'agglutination d'antigènes flagellaires dans l'essai en tube apparaît comme une floculation lâche qui peut être facilement remise en suspension.

REACTIFS

Les **Difco** Salmonella O, H et Vi Antisera (sérum anti-salmonella O, H et Vi Difco) sont des antisérums de lapin polyclonaux lyophilisés, contenant environ 0,04 % de thimérolal comme conservateur.

Les **Difco** Salmonella O Poly Antisera sont des antisérums polyvalents. Chaque antisérum est spécifique pour certains antigènes de sérogroupes. Lorsqu'ils sont correctement réhydratés et utilisés selon les recommandations, chaque flacon de **Difco** Salmonella O ou Vi Antisera contient suffisamment de réactif pour 60 tests. Les **Difco** Salmonella O Poly A-I et Vi Antisera sont préparés avec des souches représentatives de ces sérogroupes et ne sont pas absorbés. Ils pourraient produire une réaction croisée à cause des antigènes O communs partagés.

Les **Difco** Salmonella O Group Antisera sont spécifiques des facteurs principaux présents dans le séro groupe. Les **Difco** Salmonella O Factor Antisera sont spécifiques des facteurs des sérogroupes individuels. Lors de l'utilisation des **Difco** Salmonella O Group Antisera, des réactions croisées sont possibles car les sérogroupes peuvent partager des antigènes de groupes non-principaux. Les **Difco** Salmonella O Factor Antisera sont absorbés selon la nécessité de rendre chaque antisérum aussi spécifique que pratique sans réduire les réactions homologues à un niveau non satisfaisant.

Les **Difco** Salmonella H Poly Antisera sont des antisérums polyvalents spécifiques à certains antigènes flagellaires. Chaque flacon de **Difco** Salmonella H Antisera contient suffisamment de réactif pour exécuter entre 150 et 1500 tests, selon l'antisérum utilisé. Les **Difco** Salmonella H Antisera sont soit absorbés ou non absorbés spécifiquement pour les antigènes de phase 1 ou de phase 2. Les **Difco** Salmonella H Antisera Spicer-Edwards sont des antisérums groupés, polyvalents et des antisérums d'appoint supplémentaires pour identifier les antigènes H plus communs.

Avertissements et précautions

Réserve au diagnostic *in vitro*.

L'emballage de ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

Toujours utiliser des techniques aseptiques et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les échantillons, les récipients, les lames, les tubes et les autres matériels contaminés. Respecter scrupuleusement le mode d'emploi.

Conservation : Conserver les **Difco** Salmonella O, H et Vi Antisera lyophilisés et réhydratés à une température allant de 2 à 8 °C.

L'exposition prolongée des réactifs à des températures autres que les températures spécifiées a un effet adverse sur ceux-ci.

Détérioration du produit : La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions. Ne pas utiliser si le produit présente un aspect agglutiné, décoloré ou d'autres signes de détérioration.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Echantillons cliniques : La *Salmonella* peut être isolée sur des milieux sélectifs différentiels comme la gélose entérique de Hektoen ou la gélose XLD. Pour obtenir des recommandations spécifiques, consulter les références appropriées.^{11,12} Etablir qu'une culture pure de microorganismes a été obtenue et que les résultats des tests biochimiques concordent avec l'identification du microorganisme comme des espèces de *Salmonella*. Si ces conditions sont remplies, l'identification sérologique peut être effectuée.

Echantillons alimentaires : La *Salmonella* peut être isolée lorsque des échantillons sont traités pour isoler des microorganismes lésés et empêcher une croissance excessive des microorganismes en compétition. Pour les procédures recommandées d'isolement de la *Salmonella* des aliments, consulter les références appropriées.^{13,14} Etablir qu'une culture pure de microorganismes a été obtenue et que les résultats des tests biochimiques concordent avec l'identification du microorganisme comme des espèces de *Salmonella*. Si ces critères sont remplis, l'identification sérologique peut être effectuée.

L'isolat destiné au test sérologique doit être repiqué à partir d'un milieu sélectif sur une gélose non sélective.

METHODE

Matériaux fournis : **Difco** Salmonella O Antisera ; **Difco** Salmonella H Antisera ; ou **Difco** Salmonella Antiserum Vi.

Matériaux requis mais non fournis : **Test sur lame** : solution stérile de NaCl à 0,85 % ; lames à agglutination avec segments de 6,54 cm² ; écouillons ; bain-marie à ébullition ; centrifugeuse.

Essai en tube : solution stérile de NaCl à 0,85 % ; tubes à culture 12 x 75 mm et portoir ; bain-marie 50 °C ± 2 °C ; pipettes sérologiques de 1 mL ; formaldéhyde.

Préparation du réactif : Laisser tous les matériels s'équilibrer à température ambiante avant de procéder aux tests. S'assurer que la verrerie et les pipettes utilisées sont propres et exemptes de résidus (traces de détergent par exemple).

Pour reconstituer, ajouter 3 mL de solution stérile de NaCl à 0,85 % et faire tourner doucement jusqu'à dissolution complète du contenu. Les antisérums reconstitués sont considérés comme une dilution au 1 : 2.

Test d'autoagglutination de l'isolat

- Transférer une pleine anse de culture bactérienne prélevée sur un milieu de culture non sélectif, dans une goutte de solution saline stérile à 0,85 % déposée sur une lame propre et émulsionner les microorganismes.
- Agiter pendant 1 min par un mouvement de rotation de la lame, puis observer s'il se produit une réaction d'agglutination.
- Si une agglutination se produit (autoagglutination), la culture n'est pas pure et ne peut pas être testée. Répéter sur gélose non sélective, incubé et tester de nouveau le microorganisme comme expliqué aux étapes 1 et 2.
- Si aucune agglutination ne se produit, procéder au test du microorganisme.

Choix des antisérums

Sérums anti-Salmonella O : Ce schéma I d'identification sérologique (voir tableau 1 ci-dessous) commence avec les **Difco** Salmonella O Antisera Poly A à poly G, qui contiennent ce qui suit :

Sérums anti-groupe Salmonella	Groupes somatiques présents
Sérum anti-Salmonella O polyvalent A	A, B, D, E ₁ (E ₂ E ₃)*, E ₄ , L
Sérum anti-Salmonella O polyvalent B	C ₁ , C ₂ , F, G, H
Sérum anti-Salmonella O polyvalent C	I, J, K, M, N, O
Sérum anti-Salmonella O polyvalent D	P, Q, R, S, T, U
Sérum anti-Salmonella O polyvalent E	V, W, X, Y, Z
Sérum anti-Salmonella O polyvalent F	51-55
Sérum anti-Salmonella O polyvalent G	56-61

*Les souches des groupes E₂ et E₃ reçoivent un lysogène par un phage type 15, puis par un phage type 34. Ces souches sont maintenant classées dans le groupe E₁.²

Si une agglutination se produit, utiliser les **Difco** Salmonella O Group Antisera individuels pour déterminer le séro groupe spécifique auquel appartient l'isolat. Par soucis d'efficacité, tester en premier avec des **Difco** Salmonella O Group Antisera B, D et C₁ (les sérogroupes les plus communs).

Si l'agglutination ne se produit pas avec le polyvalent A ou B, tester l'isolat avec le **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si le résultat est positif, chauffer et retester avec **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si une agglutination se produit après ébullition avec **Difco** Salmonella Antiserum Vi, l'isolat n'est vraisemblablement pas *Salmonella*.

Si une agglutination ne se produit pas avec **Difco** Salmonella Antiserum Vi après ébullition, tester les cultures portées à ébullition avec des **Difco** Salmonella O Antisera individuels. Si les résultats des tests sont indéterminés, l'isolat doit être envoyé à un laboratoire de référence pour un test supplémentaire.

Si l'agglutination ne se produit pas avec les polyvalents C, D, E, F et G, l'isolat n'est vraisemblablement pas *Salmonella*.

Tableau 1. – Schéma I pour utiliser les Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F et G.

Test effectué avec	Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F et G				
Résultat de test	+	– avec Poly A ou B			– avec Poly C, D, E, F et G
Test effectué avec	Individuels Salmonella O Antisera	Salmonella O Antiserum Vi			
Résultat de test	+ avec un Salmonella O Antiserum (nécessaire)	+		–	
Test effectué avec		Chauffer et retester avec un Salmonella O Antiserum Vi			
Résultat de test	↓	+	–	↓	
Conclusion du test ou action suivante	Déterminer le Salmonella H Antigen	L'isolat à tester n'est pas une Salmonella	Tester les cultures portées à ébullition avec Salmonella O Antisera individuels	L'isolat à tester n'est pas une Salmonella	L'isolat à tester n'est pas une Salmonella

Le sérum anti-Salmonella O polyvalent A-I et Vi Schéma II (voir tableau 2 ci-dessous) : Cet antisérum détecte les facteurs 1-16, 22-25, 34 et Vi. Cette combinaison de facteurs représente les groupes A-I et les antigènes Vi les plus fréquemment isolés et est utilisée pour tester les isolats de *Salmonella* présomptifs.

Une réaction positive indique qu'il est nécessaire d'effectuer des tests sérologiques supplémentaires pour identifier l'isolat utilisant les **Difco** Salmonella O Group Antisera. Les sérogroupes les plus communs sont B, D et C₁. Par soucis d'efficacité, utiliser en premier les **Difco** Salmonella O Group Antisera pour ces sérogroupes.

Si l'isolat est positif avec le **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I et Vi mais négatif avec les antisérums somatiques spécifiques, tester l'isolat avec le **Difco** Salmonella Antiserum Vi. S'il est positif avec le **Difco** Salmonella Antiserum Vi, chauffer et retester avec le **Difco** Salmonella Antiserum Vi. S'il est positif après ébullition avec le **Difco** Salmonella O Antiserum Vi, l'isolat n'est vraisemblablement pas *Salmonella*. Si une agglutination ne se produit pas avec **Difco** Salmonella Antiserum Vi après ébullition, tester les cultures portées à ébullition avec des **Difco** Salmonella O Antisera individuels. Si les résultats des tests sont indéterminés, l'isolat doit être envoyé à un laboratoire de référence pour un test supplémentaire.

Une réaction négative avec le **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I et Vi indique que l'isolat n'est pas dans les sérogroupes A à I. Si les réactions biochimiques concordent avec *Salmonella*, l'appartenance à un séro groupe autre que les sérogroupes A à I est possible. Des tests supplémentaires avec des antisérums pour d'autres antigènes de sérogroupes est nécessaire.

Tableau 2. – Schéma II pour utiliser un Salmonella O Antiserum Poly A-I et Vi.

Test effectué avec	Salmonella O Antiserum Poly A-I et Vi				
Résultat de test	+				–
Test effectué avec	Salmonella O Antisera Individuels				
Résultat de test	+	–			–
Test effectué avec		Salmonella O Antiserum Vi			
Résultat de test		+		–	
Test effectué avec		Chauffer et retester avec Salmonella O Antiserum Vi			
Résultat de test	↓	+	–	↓	↓
Conclusion du test ou action suivante	Déterminer le Salmonella H Antigen	L'isolat à tester n'est pas une <i>Salmonella</i>	Tester les cultures portées à ébullition avec Salmonella O Antisera individuels	L'isolat à tester n'est pas une <i>Salmonella</i>	Pourrait être une <i>Salmonella</i> détectable en utilisant Salmonella O Antisera Poly C, D, E, F ou G

Facteur de groupe Salmonella O et antisérums à simple facteur : Utiliser les **Difco** Salmonella O Group Antisera sélectionnés pour une identification supplémentaire des isolats. Une réaction croisée peut se produire entre sérogroupes à antigènes O. Cette liste partielle des **Difco** Salmonella O Group Antisera doit être considérée comme un exemple :

Sérum anti-Salmonella O groupe A facteurs 1, 2, 12 ; Sérum anti-Salmonella O groupe B facteurs 1, 4, 5, 12 ; Sérum anti-Salmonella O groupe B facteurs 1, 4, 12, 27

Les facteurs 1 et 12 se produisent en association avec d'autres antigènes et peuvent entraîner des réactions croisées. La force des réactions aidera à l'interprétation. Une agglutination se formant rapidement de 3+ ou supérieure indique une réaction homologue.

Utiliser les **Difco** Salmonella O Factor Antisera sélectionnés. Les antisérums spécifiques absorbés pour un antigène identifiable dans un séro groupe donné sont utilisés pour une identification supplémentaire. Dans l'exemple ci-dessus, les **Difco** Salmonella O Factor Antisera peuvent être utilisés :

Sérum anti-Salmonella O facteur 2 ; Sérum anti-Salmonella O facteur 4 ; Sérum anti-Salmonella O facteurs 4, 5 ; Sérum anti-Salmonella O facteur 5

Sérums polyvalents anti-Salmonella H : L'identification supplémentaire d'un isolat de *Salmonella* comprend une caractérisation des antigènes flagellaires. Un séro groupage peut être effectué avec les **Difco** Polyvalent H Antisera suivants :

Sérums anti-groupe Salmonella H polyvalent	Antigènes flagellaires présents
Sérum anti-Salmonella H polyvalent a-z	complexes des groupes EN, G, L, Z ₄ , 1 et a-k, r-z, Z ₆ , Z ₁₀ , Z ₂₉
Sérum anti-Salmonella H polyvalent A	groupes a, b, c, d, i, Z ₁₀ , Z ₂₉
Sérum anti-Salmonella H polyvalent B	complexe G des groupes eh, en, enx, enz ₁₅
Sérum anti-Salmonella H polyvalent C	groupes k, l, r, y, z, Z ₄
Sérum anti-Salmonella H polyvalent D	groupes Z ₃₅ , Z ₃₆ , Z ₃₇ , Z ₃₈ , Z ₃₉ , Z ₄₁ , Z ₄₂
Sérum anti-Salmonella H polyvalent E	1 complexe, Z ₆

Les antisérums H spécifiques absorbés pour des antigènes uniques ou un complexe d'antigènes, peuvent être utilisés pour une identification supplémentaire de l'isolat.

Sérums anti-Salmonella H non absorbés et absorbés : Une identification complète de l'isolat *Salmonella* comprend l'analyse des antigènes de phase 1 et phase 2 à l'aide des sérums anti-H. Consulter les références appropriées concernant le profil complexe d'analyse et les procédures.⁹

Sérums anti-Salmonella H Spicer-Edwards : Les **Difco** Salmonella H Antisera Spicer-Edwards sont utilisés pour dépister et identifier les *Salmonella* les plus couramment rencontrées à l'aide d'une association d'antisérums complexes polyvalents et uniques.

Tableau 3. – Identification de la Salmonella H à l'aide des Salmonella H Antisera Spicer-Edwards.

H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards			
	1	2	3	4		1	2	3	4
a	+	+	+	–	k	–	+	+	+
b	+	+	–	+	r	–	+	–	+
c	+	+	–	–	y	–	+	–	–
d	+	–	+	+	z	–	–	+	+
e,h	+	–	+	–	Z ₄ Complex**	–	–	+	–
G Complex*	+	–	–	+	Z ₁₀	–	–	–	+
i	+	–	–	–	Z ₂₉	–	+	+	–

*Le composant du complexe G des sérums anti-Salmonella H Spicer-Edwards 1 et 4 réagit aux antigènes f,g ; f,g,s ; f,g,t ; g,m ; g,m,q ; g,m,s ; g,m,t ; g,p ; g,p,s ; g,p,u ; g,q ; g,s,t ; g,t ; m,p,t,u et m,t.

**Le composant du complexe Z₄ réagit aux Z₄,Z₂₃ ; Z₄,Z₂₄ et Z₄,Z₃₂.

Il convient de remarquer qu'aucun antigène ne réagit positivement aux quatre sérums anti-Salmonella H Spicer-Edwards. Le caractère lisse de tout antigène réagissant aux quatre sérums doit être vérifié.

Procédure de test sur lame

Sérums anti-Salmonella O et Vi

Utiliser cette procédure pour tester l'isolat avec chaque antisérum sélectionné.

- Déposer une goutte (35 µL) de chaque antisérum à tester sur une lame à agglutination.

- Transférer une portion d'une pleine anse d'une colonie isolée, prélevée sur un milieu gélosé solide, dans la zone réactionnelle ci-dessus et agiter vigoureusement.
- Contrôle négatif** : Déposer une goutte de solution stérile de NaCl à 0,85 % sur une lame à agglutination. Ajouter une goutte de chaque **Difco** Salmonella O Antiserum à tester sur une lame à agglutination et bien mélanger.
- Contrôle positif** : Déposer une goutte du **Difco** Salmonella O Antiserum à tester sur une lame à agglutination. Ajouter une goutte de **Difco** QC Antigen Salmonella ou de souches d'identification sérologique connue.
- Agiter pendant 1 min par un mouvement de rotation de la lame, puis observer s'il se produit une réaction d'agglutination. Les résultats doivent être lus dans la min qui suit.

Préparation de l'essai en tube

- Solution saline additionnée de formol à 0,6 %** : Préparer en ajoutant 6 mL de formaldéhyde par 1000 mL de solution stérile de NaCl à 0,85 %.
- Microorganisme à tester** : Il est souvent nécessaire d'augmenter la motilité du microorganisme de tester. Pour arriver à ce résultat, effectuer plusieurs transferts consécutifs dans un milieu de motilité GI.
 - Inoculer le tube légèrement au-dessous de la surface du milieu à l'aide de la méthode en piqûre.
 - Incuber à une température allant de 35 à 37 °C pendant 18 à 20 h.
 - Transférer seulement les microorganismes ayant migré au fond du tube.
 - Le microorganisme est prêt à être utilisé lorsqu'il se déplace de 50 à 60 mm dans le milieu en 18 à 20 h.
 - Un bouillon d'infusion comme un bouillon d'infusion de veau est recommandé pour cultiver la *Salmonella* motile avant de tester. Il doit être inoculé et incubé à 35 °C pendant 24 h. Un bouillon cœur-cerveille peut être utilisé avec une incubation à 35 °C pendant 4 à 6 h. Si un bouillon de soja tryptique est utilisé, incuber à 35 °C pendant 24 h.
 - Préparer la suspension du microorganisme à tester à l'aide de volumes égaux d'une culture en bouillon et d'une solution saline additionnée de formol à 0,6 %. La densité finale de cette suspension à tester doit être celle d'une norme standard de turbidité McFarland n° 3.
- Contrôle positif** : Des préparations commerciales d'antigènes CQ de Salmonella H ne sont pas disponibles. L'utilisateur doit maintenir des souches d'identification sérologique connue pour une utilisation en contrôle de qualité. Préparer l'antigène en utilisant des sérotypes connus et en se conformant à la procédure décrite ci-dessus. (voir **Microorganismes à tester**, ci-dessus)
- Sérums anti-Salmonella H** : Les antisérums reconstitués sont considérés comme une dilution de travail au 1 : 2. Préparer des dilutions comme suit et utiliser le jour-même. Jeter les portions non utilisées.
 - La plupart des **Sérums anti-Salmonella H** : Préparer une dilution à 1 : 250 en ajoutant 0,1 mL d'antisérum reconstitué à 25 mL de solution de NaCl à 0,85 %. Après avoir mélangé des quantités identiques (0,5 mL) d'antisérum dilué et d'isolat à tester, la dilution finale est à 1 : 1000.
 - Sérums anti-Salmonella H x, z₁₃, z₁₅ et z₂₈** : Préparer une dilution à 1 : 125 en ajoutant 0,1 mL d'antisérum reconstitué à 12,5 mL de solution de NaCl à 0,85 %. Après avoir mélangé des quantités identiques (0,5 mL) d'antisérum dilué et d'isolat à tester, la dilution finale est à 1 : 500.
 - Sérum anti-Salmonella H polyvalent a-z** : Préparer une dilution à 1 : 25 en ajoutant 0,1 mL d'antisérum reconstitué à 2,5 mL de solution de NaCl à 0,85 %. Après avoir mélangé des quantités identiques (0,5 mL) d'antisérum dilué et d'isolat à tester, la dilution finale est à 1 : 100.

Procédure d'essai en tube

Sérums anti-Salmonella H :

- Préparer un tube de culture de 12 x 75 mm pour chaque microorganisme à tester.
- Antisérum dilué** : Distribuer 0,5 mL dans chaque tube.
- Isolat à tester** : Ajouter 0,5 mL au tube correspondant.
- Contrôle positif** : Ajouter 0,5 mL de contrôle positif d'antigène à un tube contenant 0,5 mL d'antisérum.
- Contrôle négatif** : Ajouter 0,5 mL de solution de NaCl à 0,85 % dans un tube contenant 0,5 mL d'antisérum.
- Incuber tous les tubes dans un bain-marie à 50 °C ± 2 °C pendant 1 h.
- Observer s'il se produit une réaction de floculation (agglutination).
- Répéter l'essai en tube en utilisant un microorganisme à tester à phase inversée. (Voir la procédure d'**Inversion de phase** ci-dessus).

Inversion de phase

- Préparer l'inversion de phase du milieu de motilité GI conformément aux instructions.
- Préparer l'antisérum opposé à la phase désirée. Par exemple, l'incubation de la *Salmonella* Typhimurium de phase 1[i] dans un milieu de motilité GI contenant un sérum anti-i, permet la croissance et la dissémination de *S. Typhimurium* de phase 2 [1,2].
- Ajouter 1 mL d'une dilution à 1 : 10 d'antisérum à 25 mL d'un milieu de motilité GI stérile et bien mélanger. Verser dans une boîte de Pétri stérile et laisser solidifier.
- Inoculer en poussant les bords du milieu solidifié.
- Incuber à une température allant de 35 à 37 °C pendant 24 h.
- Transférer la croissance du bord de dissémination opposé au site d'inoculation dans un milieu liquide pour tester conformément aux étapes ci-dessus

Procédure d'essai en tube – Sérums anti-Salmonella H.

- Si la motilité n'est pas acceptable, passer à nouveau à travers le milieu à motilité GI.

Sérum anti-Salmonella H Spicer-Edwards :

- Préparer le microorganisme à tester et la dilution de l'antisérum à 1/2 comme décrit ci-dessus dans la préparation d'essai en tube.
- Dilution finale de l'antisérum à 1 : 1000** : Préparer en ajoutant 0,1 mL d'antisérum reconstitué (dilution de travail à 1 : 2) à 25 mL de solution de NaCl à 0,85 %.
- Préparer quatre tubes à culture (12 x 75 mm) pour chaque microorganisme à tester.
- Sérums anti-Salmonella H Spicer-Edwards 1-4** : Ajouter 0,5 mL d'antisérum dilué aux tubes à culture.
- Microorganisme à tester** : Ajouter 0,5 mL à chaque tube.
- Incuber tous les tubes dans un bain-marie à 50 °C ± 2 °C pendant 1 h.
- Retirer du bain-marie. Éviter de remuer de façon excessive lorsque les tubes sont au bain-marie ou en les retirant du bain-marie avant de lire les réactions.
- Observer s'il se produit une réaction de floculation (agglutination).

Contrôle de qualité par l'utilisateur : Tester dans la même série les témoins homologues et hétérologues pour contrôler les performances des antisérums, des techniques et de la méthodologie. Les **Difco** QC Antigens Salmonella peuvent être utilisés comme témoin homologue. Pour des informations supplémentaires, se référer à la notice d'instructions des **Difco** QC Antigens Salmonella.

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives de la NCCLS et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

RESULTATS

Test sur lame

- Lire et reporter les résultats comme suit :

4+	100% d'agglutination, fond clair à légèrement voilé.	1+	25 % d'agglutination, fond trouble.
3+	75 % d'agglutination, fond légèrement trouble.	–	Absence d'agglutination.
2+	50 % d'agglutination, fond moyennement trouble.		

- Le témoin positif doit provoquer une agglutination de niveau 3+ ou supérieur.
- Le témoin négatif ne doit présenter aucune agglutination.
- S'agissant des isolats à tester, une agglutination de niveau 3+ ou supérieur constitue un résultat positif.
- Une réaction partielle (moins de 3+) ou retardée doit être considérée comme étant négative.
- Si l'identification d'un antigène H est nécessaire, procéder à la section suivante.

Essai en tube

- Lire et reporter les résultats comme suit :

4+	100% d'agglutination ; fond clair à légèrement voilé.	1+	25% d'agglutination ; fond trouble.
3+	75% d'agglutination ; fond légèrement trouble.	–	Absence d'agglutination.
2+	50% d'agglutination ; fond moyennement trouble.		

- Le contrôle positif doit présenter une agglutination de 3+ ou plus à la dilution du test de routine (routine test dilution, RTD).
- Le témoin négatif ne doit présenter aucune agglutination.

Lors de l'utilisation du **Difco** Salmonella H Spicer-Edwards, comparer les résultats avec les motifs de floculation (agglutination) pour les schémas de Spicer-Edwards (voir tableau 3, page 3).

LIMITES DE LA PROCEDURE

- Une caractérisation complète de l'antigène O et H d'un isolat de *Salmonella* est nécessaire pour l'identification finale. À cause de la complexité des procédures de laboratoires, l'identification avec des antisérums polyvalents peut être suffisante pour la plupart des laboratoires.
- Les isolats de *Salmonella* éventuels présentant des incohérences dans des réactions biochimiques et des tests des antigènes O et H, doivent être envoyés à un laboratoire de référence pour des tests supplémentaires.
- Une source de chaleur externe excessive (anse d'ensemencement brûlante, flamme du bec bunsen, source lumineuse, etc.) peut empêcher d'obtenir une suspension fluide du microorganisme ou entraîner l'évaporation ou la précipitation du mélange réactionnel. De faux positifs risquent d'être obtenus.
- Des isolats de culture non purs sont parfois obtenus et provoquent une agglutination spontanée entraînant l'agglutination des témoins négatifs (autoagglutination). Choisir des colonies lisses et les tester suivant les méthodes sérologiques.
- Dans la méthode d'agglutination sur lame pour tester l'antigène O, il est recommandé que plusieurs colonies soient testées et que les antisérums non absorbés polyvalents soient utilisés suivis par des antisérums à facteur simple. Par exemple, les colonies d'une culture 1, 2, 12 sur une gélose en boîte de Pétri auront des degrés variables pour chaque antigène. Un antisérum 1, 2, 12 absorbe d'anticorps 1 et 12 seront très spécifiques mais présenteront une agglutination faible ou une absence d'agglutination avec des colonies ayant moins d'antigènes 2 et plus d'antigènes 1 et 12. Pour obtenir l'équilibre nécessaire de sensibilité et de spécificité, utiliser du **Difco** Salmonella O Antiserum Group A non absorbé de facteurs 1, 2, 12 pour tester plusieurs colonies suspectes sur une boîte de Pétri, suivi d'un test avec du **Difco** Salmonella O Antiserum absorbé de facteur 2.
- Les réactions d'agglutination de 3+ ou supérieures sont interprétées comme des réactions positives. Les réactions croisées résultant d'une agglutination de 1+ ou 2+ sont plus probables étant donné que des antigènes somatiques sont partagés entre différents groupes comme des antigènes de groupes non principaux.
- Il peut exister des antigènes communs entre les divers sérogroupes « O » de *Salmonella*. Par exemple, le **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A contient, entre autres, des agglutinines pour facteurs 1, étant donné que les cultures possédant un facteur 1 étaient utilisées en immunisation. Cet antisérum polyvalent risque de réagir avec des cultures autres que celles contenues dans les sérogroupes « O » A, B, D, E et L à cause de l'antigène commun 1 (ces microorganismes en groupe G₁, G₂, H, R, T, etc., contenant un facteur 1).
- Le **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I et Vi a été préparé avec des membres représentatifs de ces groupes somatiques et n'a pas été absorbé. Il est évident que ce sérum peut réagir et réagira avec des groupes O plus élevés de *Salmonella*.
- La technique d'agglutination en tube est recommandée pour tester l'antigène H car des réactions croisées avec les antigènes somatiques peuvent se produire aux dilutions utilisées dans les techniques sur lame.
- Il convient de s'assurer, dans l'essai en tube, que la dilution correcte est préparée pour un antisérum donné. Diverses dilutions sont utilisées pour divers antisérums. Pour plus de détails, se référer à la section **Préparation de l'essai en tube**.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Sérums anti-salmonella O et sérum anti-salmonella Vi : La sensibilité aux Difco Salmonella O Antisera et au Salmonella Antiserum Vi est déterminée en démontrant une réactivité conforme contre une batterie de cultures homologues de *Salmonella*, comme définie dans la section Résultats, Test sur lame (voir tableau 4, page 10). La spécificité est déterminée en démontrant une absence de réactivité contre les groupes non-apparentés de *Salmonella* (hétérologues).

Sérums anti-Salmonella H

La sensibilité aux **Difco** Salmonella H Antisera est déterminée en démontrant une réactivité conforme contre une batterie de cultures homologues de *Salmonella*, comme définie dans la section Résultats, Essai en tube (voir tableau 5, page 11). La spécificité est déterminée en démontrant une absence de réactivité contre les groupes non-apparentés de *Salmonella* (hétérologues).

CONDITIONNEMENT : voir page 12.

REFERENCES : Voir la rubrique « References » du texte anglais.

BD Difco Salmonella O Antisera Difco Salmonella H Antisera Difco Salmonella Antiserum Vi

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Difco Salmonella O Antisera werden bei Objektträger-Agglutinationstests zur Identifizierung von *Salmonella* durch somatische (O) Antigene verwendet.

Difco Salmonella H Antisera werden bei Röhrchen-Agglutinationstests zur Identifizierung von *Salmonella* durch flagellare (H) Antigene verwendet.

Difco Salmonella Vi Antiserum wird bei Objektträger-Agglutinationstests zur Identifizierung von *Salmonella* Vi verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Salmonella-Spezies verursachen eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen, die so genannten Salmonellosen. Diese Erkrankungen reichen von milden Formen selbst-beschränkender Gastroenteritis bis zu schwereren, lebensgefährlichen Formen mit Bakteriämien oder Typhusfieber. Schwere Erkrankungen und Bakteriämien werden primär mit drei Serovaren von *S. enterica*, Subspezies *enterica* (*Choleraesuis*, *Paratyphi* A und *Typhi*) assoziiert, wohingegen die meisten anderen 2300 Stämme mit der Gastroenteritis in Zusammenhang gebracht werden. Der Schweregrad der Diarrhö ist abhängig von der Virulenz des Stammes und dem Zustand des menschlichen Wirts. *Salmonella* kommen in der Natur und im Darmtrakt vieler Tiere, sowohl wilder Tiere als auch Haustiere, vor. Der Mikroorganismus kann sich durch Kontakt mit der Umgebung oder durch den Verzehr von Fleisch oder Gemüse auf den Menschen übertragen.

Alle *Salmonella*-Serovare gehören zwei Spezies an: *S. bongori* mit 18 Serovaren und *S. enterica* mit den verbleibenden 2300 oder mehr Serovaren, die sich in sechs Subspezies unterteilen lassen.^{1,2}

Die sechs Subspezies von *S. enterica* sind:

S. enterica subsp. *enterica* (I oder 1)
S. enterica subsp. *salamae* (II oder 2)

S. enterica subsp. *arizonae* (IIIa oder 3a)
S. enterica subsp. *diarizonae* (IIIb oder 3b)

S. enterica subsp. *houtenae* (IV oder 4)
S. enterica subsp. *indica* (VI oder 6)

Die Nomenklatur und Klassifizierung dieser Bakterien ändert sich fortwährend.³ *Salmonella* und die ehemaligen *Arizona* sind als ein einziger Genus, *Salmonella*, zu betrachten.⁴ Es wird empfohlen, dass Labors die Namen der *Salmonella*-Serovare für die Subspezies *enterica* dokumentieren. Die Namen für die Serovare werden nicht länger kursiv geschrieben, und der erste Buchstabe wird groß geschrieben. So wird der bisher als *Salmonella typhimurium* identifizierte Stamm jetzt als *Salmonella* Typhimurium bezeichnet.

Serovare anderer Subspezies von *S. enterica* (mit Ausnahme einiger der Subspezies *salamae* und *houtenae*) und Serovare von *S. bongori* werden nicht benannt sondern durch ihre Antigenformel gekennzeichnet. Aktuelle Informationen zur Nomenklatur einschlägigen Quellen entnehmen.¹⁻¹⁰

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Salmonella O-Antigene sind somatische (O) hitzeresistente Antigene, die als erstes identifiziert werden. Das Vi-Antigen ist ein hitzelabiles Hüllenantigen, welches eine Zellwand umgeben und die Aktivität der somatischen Antigene verbergen kann. Mikroorganismen mit dem Vi-Antigen agglutinieren nicht in O-Antisera. Zur Bestimmung des O-Antigens dieser Kulturen muss eine Suspension des Organismus zur Zerstörung des hitzelabilen Hüllenantigens gekocht und dann mit O-Antisera getestet werden. Die flagellaren (H) Antigene sind hitzelabil und sind bekannt für ihre Motilität.

Zum erfolgreichen Nachweis des Mikroorganismus ist keine vollständige serologische Charakterisierung von *Salmonella* erforderlich, wenn es als Pathogen auftritt. Die Anwendung geeigneter Isolationsverfahren und differenzierter biochemischer Tests ist von primärer Bedeutung. Mögliche *Salmonella*-Isolate lassen sich mit einem Minimum an serologischer Identifizierung präsumtiv identifizieren. Isolate können an Labors gesendet werden, die die entsprechende Teststufe für die vollständige Identifizierung des Mikroorganismus durchführen.

Für eine weitere Diskussion der serologischen Identifikation von *Salmonella* die einschlägigen Quellen konsultieren.^{1-3,9,11-14}

Die Identifikation von *Salmonella*-Spezies umfasst sowohl den biochemischen als auch den serologischen Nachweis. Zur serologischen Bestätigung gehört ein Verfahren, bei dem der Mikroorganismus (Antigen) mit dem entsprechenden Antikörper reagiert. Bei dieser *In-vitro*-Reaktion kommt es zu makroskopischen Verklumpungen, der so genannten Agglutination. Die gewünschte homologe Reaktion sollte rasch, ohne Dissoziation (hohe Avidität) und mit fester Bindung (hoher Affinität) erfolgen.

Da ein Mikroorganismus (Antigen) auch mit Antikörpern agglutinieren kann, die als Reaktion auf eine andere Spezies gebildet wurden, sind heterologe Reaktionen möglich. Diese zeichnen sich durch einen langsamen und schwachen Reaktionsverlauf aus. Derartige unerwartete und evtl. unvorhersehbare Reaktionen können bei der serologischen Identifizierung einige Verwirrung stiften. Daher sollte eine positive homologe Agglutinationsreaktion die morphologische und biochemische Identifizierung des Mikroorganismus unterstützen.

Die Agglutination des somatischen Antigens beim Objektträger test zeigt sich als fester, körniger Klumpen. Homologe Reaktionen laufen schnell und heftig ab (3+). Heterologe Reaktionen laufen langsam und schwach ab.

Die Agglutination flagellarer Antigene beim Röhrchentest zeigt sich als lockere Flockenbildung, die sich leicht erneut suspendieren lässt.

REAGENZIEN

Difco Salmonella O, H und Vi Antisera sind lyophilisierte, polyklonale Kaninchen-Antisera, die ungefähr 0,04 % Thimerosal Konservierungsmittel enthalten.

Difco Salmonella O Poly Antisera sind polyvalente Antisera. Jedes Antiserum ist spezifisch für bestimmte Serogruppen-Antigene. Bei korrekter Rehydrierung und schriftsmäßiger Anwendung enthält jedes Fläschchen **Difco** Salmonella O oder Vi Antisera eine ausreichende Reagenziemenge für 60 Tests. **Difco** Salmonella O Poly A-I und Vi Antisera werden mit repräsentativen Stämmen dieser Serogruppen vorbereitet und werden nicht absorbiert. Aufgrund gemeinsamer O-Antigene können sie Kreuzreaktionen zeigen.

Difco Salmonella O Group Antisera sind spezifisch für die in der Serogruppe vorhandenen Hauptfaktoren. **Difco** Salmonella O Factor Antisera sind spezifisch für die Faktoren der einzelnen Serogruppen. Bei Verwendung von **Difco** Salmonella O Group Antisera sind Kreuzreaktionen möglich, da die Serogruppen

Nebengruppen-Antigene gemeinsam nutzen können. **Difco** Salmonella O Factor Antisera sind absorbiert, um nach Bedarf jedes Antiserum so spezifisch wie möglich zu machen, ohne dabei die homologen Reaktionen auf ein unzureichendes Niveau zu senken.

Die polyvalenten Antisera **Difco** Salmonella H Poly Antisera sind spezifisch für bestimmte flagellare Antigene. Jedes Fläschchen **Difco** Salmonella H Antisera enthält ausreichend Reagenz für 150 bis 1500 Tests, je nach verwendeten Antiserum. **Difco** Salmonella H Antisera werden entweder absorbiert oder auch nicht, je nachdem ob es sich um Antigene der Phase 1 oder der Phase 2 handelt. **Difco** Salmonella H Antisera Spicer-Edwards sind gepoolte, polyvalente Antisera und darüber hinaus adjunktive Antisera zur Identifizierung der am häufigsten auftretenden H-Antigene.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

In-vitro-Diagnostikum.

Die Verpackung dieses Produkts enthält Naturkautschuk (getrocknet).

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen und Verwendung aseptischer Techniken erfolgen. Nach Gebrauch sind Proben, Behälter, Objektträger, Röhrchen und sonstiges kontaminiertes Material im Autoklaven zu sterilisieren. Die Gebrauchsanleitung ist sorgfältig zu befolgen.

Aufbewahrung: Lyophilisierte und rehydrierte **Difco** Salmonella O, H und Vi Antisera bei 2 bis 8 °C aufbewahren.

Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.

Halbbarkeit des Produkts: Das Verfallsdatum gilt für das im unversehrten Behälter aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften. Zusammenlebendes, verfärbtes oder sonstige Verfallsanzeichen aufweisendes Produkt nicht verwenden.

PROBENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Klinische Proben: *Salmonella* können aus selektiven differenzierten Medien, wie beispielsweise Hektoen Enteric Agar oder XLD Agar gewonnen werden. Für spezifische Empfehlungen einschlägige Quellen konsultieren.^{11,12} Sicherstellen, dass eine Reinkultur des Mikroorganismus gewonnen wurde, und dass die biochemischen Testreaktionen der Identifizierung des Organismus als *Salmonella*-Spezies entsprechen. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann die serologische Identifizierung durchgeführt werden.

Nahrungsmittelproben: *Salmonella* können gewonnen werden, wenn bei den Proben das Überwachen durch konkurrierende Mikroorganismen verhindert wird und die Wiedergewinnung verletzter Mikroorganismen gewährleistet ist. Empfehlungen zur Isolierung von *Salmonella* aus Nahrungsmitteln einschlägigen Quellen entnehmen.^{13,14} Sicherstellen, dass eine Reinkultur des Mikroorganismus gewonnen wurde und die biochemischen Testreaktionen der Identifizierung des Organismus als *Salmonella*-Spezies entsprechen. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann die serologische Identifizierung durchgeführt werden.

Isolate für serologische Tests sollten aus Subkulturen des Selektiv-Mediums auf einem nicht selektiven Agar gewonnen werden.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: **Difco** Salmonella O Antisera; **Difco** Salmonella H Antisera oder **Difco** Salmonella Antiserum Vi.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Objektträgertest: sterile 0,85%ige NaCl-Lösung, Agglutinations-Objektträger mit 2,5-cm-Feldern; kochendes Wasserbad, Zentrifuge.

Röhrchentest: sterile 0,85%ige NaCl-Lösung, Kulturröhrchen, 12 x 75 mm und Ständer; Wasserbad, 50 ± 2 °C; serologische 1-mL-Pipetten, Formaldehyd.

Vorbereitung der Reagenzien: Vor der Testdurchführung alle Materialien auf Zimmertemperatur äquilibrieren lassen. Sicherstellen, dass alle gläsernen Utensilien und Pipetten sauber sind und keine Rückstände aufweisen (wie z. B. von Reinigungsmitteln).

Zur Rekonstitution 3 mL sterile 0,85%ige NaCl-Lösung zugeben und behutsam drehen, um den Inhalt vollständig zu lösen. Rekonstituierte Antisera stellen eine Verdünnung im Verhältnis 1:2 dar.

Testisolat für die Autoagglutination

- Eine Impföse voll Wachstum von der Testkultur auf nichtselektivem Agar zu einem Tropfen steriler 0,85%iger Kochsalzlösung auf einen sauberen Objektträger transferieren und den Organismus emulgieren.
- Den Objektträger 1 min lang drehen und anschließend im Hinblick auf Agglutination begutachten.
- Falls es zu einer Agglutination (Autoagglutination) kommt, ist die Kultur grob und nicht zum Testen geeignet. Eine Subkultur auf nichtselektivem Agar anlegen, inkubieren und den Organismus erneut testen, wie in den Schritten 1 und 2 beschrieben.
- Kommt es nicht zu einer Agglutination, mit dem Testen des Organismus fortfahren.

Wahl der Antisera

Salmonella O Antisera: Dieses Schema zur serologischen Identifikation I (siehe folgende Tabelle 1) beginnt mit **Difco** Salmonella O Antisera Poly A bis Poly G, die Folgendes beinhalten:

Salmonella Group Antisera	Vorliegende somatische Gruppen
Salmonella O Antiserum Poly A	A, B, D, E ₁ (E ₂ , E ₃)*, E ₄ , L
Salmonella O Antiserum Poly B	C ₁ , C ₂ , F, G, H
Salmonella O Antiserum Poly C	I, J, K, M, N, O
Salmonella O Antiserum Poly D	P, Q, R, S, T, U
Salmonella O Antiserum Poly E	V, W, X, Y, Z
Salmonella O Antiserum Poly F	51-55
Salmonella O Antiserum Poly G	56-61

*Stämme der Gruppen E₂ und E₃ werden mit Phase 15 und dann mit Phase 34 lysogenisiert. Diese Stämme zählen jetzt zur Gruppe E₁.²

Wenn es zu einer Agglutination kommt, einzelne **Difco** Salmonella O Group Antisera zur Bestimmung der spezifischen Serogruppe, zu der das Isolat gehört, verwenden. Zur besseren Effizienz zunächst mit einzelnen **Difco** Salmonella O Group Antisera B, D und C₁ testen (den gängigsten Serogruppen).

Wenn es zu keiner Agglutination mit Poly A oder B kommt, das Isolat mit **Difco** Salmonella Antiserum Vi testen. Wenn möglich, erhitzen und mit **Difco** Salmonella Antiserum Vi erneut testen. Wenn es nach dem Kochen mit **Difco** Salmonella Antiserum Vi zu einer Agglutination kommt, handelt es sich bei dem Isolat wahrscheinlich nicht um *Salmonella*. Wenn es nach dem Kochen mit **Difco** Salmonella Antiserum Vi nicht zu einer Agglutination kommt, die gekochte Kultur mit einzelnen **Difco** Salmonella O Antisera testen. Wenn die Testergebnisse nicht eindeutig sind, sollte das Isolat für weitere Tests an ein Referenzlabor geschickt werden.

Wenn es mit Poly C, D, E, F und G nicht zu einer Agglutination kommt, handelt es sich bei dem Isolat wahrscheinlich nicht um *Salmonella*.

Tabelle 1. – Schema I für die Verwendung von Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F und G.

Test mit	Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F und G				
Testergebnis	+	– mit Poly A oder B			– mit Poly C, D, E, F und G
Test mit	Individuellen Salmonella O Antisera	Salmonella O Antiserum Vi			
Testergebnis	+ mit einem Salmonella O Antiserum (erforderlich)	+	–		
Test mit		Erhitzen und erneut mit Salmonella O Antiserum Vi			
Testergebnis		+	–		
Testergebnis oder nächste Maßnahme	Nachweis des Salmonella H Antigen	Testisolat ist kein <i>Salmonella</i>	Gekochte Kultur mit individuellen testen Salmonella O Antisera	Testisolat ist kein <i>Salmonella</i>	Testisolat ist kein <i>Salmonella</i>

Schema II zu Salmonella O Antiserum Poly A-I und Vi (siehe folgende Tabelle 2): Das Antiserum erkennt die Faktoren 1 - 16, 19, 22 - 25, 34 und Vi. Diese Faktorenkombination repräsentiert die am häufigsten isolierten Gruppen A-I und Vi-Antigene, die für das Screening auf mögliche *Salmonella*-Isolate verwendet werden.

Eine positive Reaktion zeigt, dass weitere serologische Tests erforderlich sind, um das Isolat mit **Difco** Salmonella O Group Antisera zu identifizieren. Die gängigsten Serogruppen sind B, D und C₁. Zur besseren Effizienz zunächst mit **Difco** Salmonella O Group Antisera für diese Serogruppen testen.

Wenn das Ergebnis nach dem Kochen mit **Difco** Salmonella Antiserum Poly A-I & Vi positiv ausfällt, jedoch negativ mit den spezifischen somatischen Antisera, das Isolat mit **Difco** Salmonella O Antiserum Vi testen. Wenn möglich, erhitzen und mit **Difco** Salmonella Antiserum Vi erneut testen. Wenn das Ergebnis nach dem Kochen mit **Difco** Salmonella Antiserum Vi positiv ausfällt, handelt es sich bei dem Isolat wahrscheinlich nicht um *Salmonella*. Wenn es nach dem Kochen mit **Difco** Salmonella Antiserum Vi nicht zu einer Agglutination kommt, die gekochte Kultur mit einzelnen **Difco** Salmonella O Antisera testen. Wenn die Testergebnisse nicht eindeutig sind, sollte das Isolat für weitere Tests an ein Referenzlabor geschickt werden.

Wenn das Ergebnis nach dem Kochen mit **Difco** Salmonella Antiserum Poly A-I & Vi negativ ausfällt, zeigt dies, dass das Isolat nicht zur Serogruppe A-I gehört. Wenn die biochemischen Reaktionen mit *Salmonella* übereinstimmen, ist eine andere Serogruppe als A-I möglich. Es sind weitere Tests mit Antisera für Antigene anderer Serogruppen erforderlich.

Tabelle 2. – Schema II für die Verwendung von Salmonella O Antiserum Poly A-I und Vi.

Abbildung 21: Schema H für die Verwendung von Salmonella O Antiserum Poly A-I und Vi					
Test mit	Salmonella O Antiserum Poly A-I und Vi				
Testergebnis	+			–	
Test mit	Individuellen Salmonella O Antisera				
Testergebnis	+	–			
Test mit		Salmonella O Antiserum Vi			
Testergebnis		+	–		
Test mit		Erhitzen und erneut mit Salmonella O Antiserum Vi			
Testergebnis		+	–		
Testergebnis	↓	+	–	↓	↓
Testergebnis oder nächste Maßnahme	Nachweis des Salmonella H Antigen	Testisolat ist kein <i>Salmonella</i>	Gekochte Kultur mit individuellen testen Salmonella O Antisera	Testisolat ist kein <i>Salmonella</i>	Vielleicht ein <i>Salmonella</i> feststellbar durch die Verwendung von Salmonella O Antisera Poly C, D, E, F oder G

Salmonella O Group Factor und Single Factor Antisera: Ausgewählte **Difco** Salmonella O Group Antisera zur weiteren Identifizierung von Isolaten verwenden. Kreuzreaktionen können zwischen Serogruppen auftreten, die gemeinsame O-Antigene nutzen. Den folgenden Teil einer Liste von **Difco** Salmonella O Group Antisera als Beispiel betrachten:

Salmonella O Antiserum Group A Factors 1, 2, 12; Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 5, 12; Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 12, 27

Die Faktoren 1 und 12 treten in Verbindung mit anderen Antigenen auf und können zu Kreuzreaktionen führen. Die Reaktionsstärke hilft bei der Interpretation. Sich schnell bildende Agglutinationen der Stärke 3+ oder stärker zeigen eine homologe Reaktion an.

Ausgewählte **Difco** Salmonella O Factor Antisera verwenden. Absorbierte Antisera, die spezifisch sind für ein identifizierbares Antigen in einer bestimmten Serogruppe, werden zur weiteren Identifizierung des Isolats verwendet. In dem Beispiel oben können **Difco** Salmonella O Factor Antisera verwendet werden:

Salmonella O Antiserum Factor 2; Salmonella O Antiserum Factor 4; Salmonella O Antiserum Factors 4, 5; Salmonella O Antiserum Factor 5

Polyvalent Salmonella H Antisera: Weitere Identifizierung eines *Salmonella*-Isolats umfasst die Charakterisierung der Flagellar-Antigene. Eine Serogruppierung kann mit folgenden **Difco** Polyvalent H Antisera durchgeführt werden:

Salmonella H Poly Group Antisera	Vorliegende flagellare Antigene
Salmonella H Antiserum Poly a-z	Gruppen EN, G, L, Z ₄ , 1-Komplexe und a-k, r-z, Z ₆ , Z ₁₀ , Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly A	Gruppen a, b, c, d, i, Z ₁₀ , Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly B	Gruppen eh, en, enx, enz ₁₅ , G-Komplex
Salmonella H Antiserum Poly C	Gruppen k, l, r, y, z, Z ₄
Salmonella H Antiserum Poly D	Gruppen Z ₃₅ , Z ₃₆ , Z ₃₇ , Z ₃₈ , Z ₃₉ , Z ₄₁ , Z ₄₂
Salmonella H Antiserum Poly E	1-Komplex, Z ₆

Absorbierte H-Antisera, spezifisch für einzelne Antigene oder einen Antigenkomplex, können zur weiteren Identifizierung des Isolats verwendet werden.

Nicht absorbierte und absorbierte Salmonella H Antisera: Die vollständige Identifizierung eines *Salmonella*-Isolats umfasst die Analyse der Antigene der Phase 1 und der Phase 2 mithilfe von H-Antisera. Das komplexe Analyse- und Verfahrensmuster einschlägigen Quellen entnehmen.⁹

Salmonella H Antisera Spicer-Edwards: **Difco** Salmonella H Antisera Spicer-Edwards werden zum Screening und zur Identifizierung der am häufigsten festgestellten *Salmonella* mithilfe einer Kombination aus polyvalenten und einzelnen komplexen Antisera verwendet.

Tabelle 3. – Identifikation von Salmonella H mithilfe von Salmonella H Antisera Spicer-Edwards.

H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards			
	1	2	3	4		1	2	3	4
a	+	+	+	–	k	–	+	+	+
b	+	+	–	+	r	–	+	–	+
c	+	+	–	–	y	–	+	–	–
d	+	–	+	+	z	–	–	+	+
e,h	+	–	+	–	Z ₄ Complex**	–	–	+	–
G Complex*	+	–	–	+	z ₁₀	–	–	–	+
i	+	–	–	–	z ₂₉	–	+	+	–

*Die G-Komplexkomponente von Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1 und 4 reagiert mit den Antigenen f, g; f, g, s; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s; g, m, s, t; g, m, t; g, p; g, p, s; g, p, u; u; g, q; g, s, t; g, t; m, p, t, u und m, t.

**Die Z₄-Komplexkomponente reagiert mit Z₄, Z₂₃, Z₄, Z₂₄ und Z₄, Z₃₂.

Es ist zu beachten, dass keinem der vier Salmonella H Antisera Spicer-Edwards ein Antigen positiv ist. Alle Antigene, die mit den vier Seren reagieren, sind auf Gleichmäßigkeit und Glattheit zu kontrollieren.

Objektträger-Testverfahren

Salmonella O und Vi Antisera

Dieses Verfahren zum Testen des Isolats mit jedem ausgewählten Antiserum verwenden.

- Einen Tropfen (35 µL) jedes Antisera auf einen Agglutinations-Objektträger geben.
- Von einem festen Agarmedium einen Teil einer Öse voll Wachstum einer isolierten Kolonie auf die oben genannten Reaktionsbereiche geben und gründlich durchmischen.
- Negative Kontrolle:** Einen Tropfen 0,85%iger NaCl-Lösung auf einen Agglutinations-Objektträger geben. Einen Tropfen des zu testenden **Difco** Salmonella O Antiserum auf einen Agglutinations-Objektträger geben und gründlich durchmischen.
- Positive Kontrolle:** Einen Tropfen des zu testenden **Difco** Salmonella O Antiserum auf einen Agglutinations-Objektträger geben. 1 Tropfen eines geeigneten **Difco** QC Antigen Salmonella oder einer Stammkultur mit bekannter serologischer Identifikation hinzufügen.
- Die Objektträger 1 min lang drehen und anschließend im Hinblick auf Agglutination begutachten. Die Ergebnisse müssen innerhalb 1 min abgelesen werden.

Vorbereitung des Röhrchentests

- 0,6 % formalisierte Kochsalzlösung:** Vorbereiten durch Zugabe von 6 mL Formaldehyd auf 1000 mL steriler, 0,85%iger NaCl-Lösung.
- Testorganismus:** Häufig ist eine Steigerung der Motilität des Testorganismus erforderlich. Hierzu mehrere aufeinander folgende Übertragungen in das Motilitäts-GI-Medium durchführen.
 - Das Röhrchen leicht unter der Oberfläche des Mediums durch Anstechen inokulieren.
 - 18 bis 20 h lang bei 35 – 37 °C inkubieren.
 - Nur die Organismen transferieren, die zum Boden des Röhrchens migriert sind.
 - Wenn der Organismus in 18 bis 20 h 50 bis 60 mm durch das Medium gewandert ist, ist er gebrauchsfertig.
 - Zur Kultivierung motiler *Salmonella* vor dem Test wird eine Infusionsbouillon, wie beispielsweise Kalbfleisch-Infusionsbouillon, empfohlen. Die Bouillon sollte 24 h lang bei 35 °C inokuliert und inkubiert werden. Hirn-Herz-Infusionsbouillon kann für eine 4- bis 6-stündige Inkubation bei 35 °C verwendet werden. Wenn tryptische Soyabouillon verwendet wird, 24 h lang bei 35 °C inkubieren.
 - Die Testorganismus-Suspension durch Verwendung gleicher Anteile Bouillonkultur und 0,6 % formalisierter Kochsalzlösung vorbereiten. Die Enddichte dieser Testsuspension sollte dem McFarland-Trübheitsstandard von 3 entsprechen.
- Positive Kontrolle:** Handelsüblich vorbereitete QC Salmonella H Antisera sind nicht verfügbar. Der Anwender muss Stammkulturen bekannter serologischer Identifikation für die Verwendung bei der Qualitätskontrolle kultivieren. Das Antigen mithilfe bekannter Serotypen vorbereiten und das oben beschriebene Verfahren befolgen. (siehe **Testorganismus** oben).
- Salmonella H Antisera:** Rekonstituierte Antisera sind als Arbeitslösung 1:2 zu betrachten. Die Verdünnungen wie folgt vorbereiten und am Vorbereitungstag aufbrauchen. Nicht verwendete Anteile entsorgen.
 - Die meisten **Salmonella H Antisera:** Eine Verdünnung im Verhältnis 1:250 vorbereiten. Hierzu 0,1 mL rekonstituiertes Antiserum zu 25 mL 0,85%iger NaCl-Lösung geben. Nach dem Mischen von verdünntem Antiserum und Testisolat zu gleichen Teilen (0,5 mL) beträgt die endgültige Verdünnung 1:1000.
 - Salmonella H Antisera x, Z₁₃, Z₁₅ und Z₂₈:** Eine Verdünnung im Verhältnis 1:125 vorbereiten. Hierzu 0,1 mL rekonstituiertes Antiserum zu 12,5 mL 0,85%iger NaCl-Lösung geben. Nach dem Mischen von verdünntem Antiserum und Testisolat zu gleichen Teilen (0,5 mL) beträgt die endgültige Verdünnung 1:500.
 - Salmonella H Antiserum Poly a-z:** Eine Verdünnung im Verhältnis 1:25 vorbereiten. Hierzu 0,1 mL rekonstituiertes Antiserum zu 2,5 mL 0,85%iger NaCl-Lösung geben. Nach dem Mischen von verdünntem Antiserum und Testisolat zu gleichen Teilen (0,5 mL) beträgt die endgültige Verdünnung 1:100.

Röhrchen-Testverfahren:

Salmonella H Antisera

- Für jede zu untersuchende Probe ein 12 x 75 mm-Kulturröhrchen vorbereiten.
- Verdünntes Antiserum:** 0,5 mL in jedes Röhrchen geben.
- Testisolat:** 0,5 mL in das entsprechende Röhrchen geben.
- Positive Kontrolle:** Einem Röhrchen mit 0,5 mL Antiserum 0,5 mL des positiven Kontrollantigens hinzufügen.

5. **Negative Kontrolle:** Einem Röhrchen mit 0,5 mL des Testisolats 0,5 mL 0,85%ige NaCl-Lösung hinzufügen.
6. Alle Röhrchen 1 h lang im Wasserbad bei 50 ± 2 °C inkubieren.
7. Auf Flockenbildung (Agglutination) überprüfen.
8. Den Röhrchentest mit einem phasenumgekehrten Testorganismus wiederholen (siehe das Verfahren für die **Phasenumkehr** unten).

Phasenumkehr

1. Das phasenumgekehrte Medium für das Motilitäts-GI-Medium gemäß den Anweisungen vorbereiten.
2. Das Antiserum mit der entsprechend komplementären Phase vorbereiten. So ermöglicht beispielsweise die Inkubation von *Salmonella* Typhimurium Phase 1[i] in Motilitäts-GI-Medium mit i-Antiserum das Wachstum und die Verbreitung von S. Typhimurium Phase 2 [1,2].
3. 25 mL sterilem Motilitäts-GI-Medium 1 mL einer Antiserumverdünnung im Verhältnis 1:10 hinzufügen und gut durchmischen. In eine sterile Petrischale gießen und verfestigen lassen.
4. Durch Einstechen am Rand des verfestigten Mediums inokulieren.
5. 24 h lang bei 35 – 37 °C inkubieren.
6. Wachstum vom Verbreitungsrand gegenüber der Inokulationsstelle gemäß den Schritten unter „**Röhrchen-Testverfahren – Salmonella H Antisera**“ auf ein Flüssigkeitsmedium übertragen.
7. Ist die Motilität nicht ausreichend, erneut durch ein Motilitäts-GI-Medium passieren lassen.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards

1. Testorganismus und die Antiserumverdünnung im Verhältnis 1:2, wie oben unter „Röhrchen-Testverfahren“ beschrieben, vorbereiten.
2. **Endgültige 1:1000-Verdünnung des Antiserums:** Vorbereiten durch Hinzufügen von 0,1 mL rekonstituiertem Antiserum (Arbeitsverdünnung 1:2) zu 25 mL 0,85%iger NaCl-Lösung.
3. 4 Kulturröhrchen (12 x 75 mm) für jeden Testorganismus vorbereiten.
4. **Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1-4:** 0,5 mL des verdünnten Antiserums in die Kulturröhrchen geben.
5. **Testorganismus:** 0,5 mL in jedes Röhrchen geben.
6. Röhrchen eine Stunde lang im Wasserbad bei 50 ± 2 °C inkubieren.
7. Aus dem Wasserbad entfernen. Wenn sich die Röhrchen im Wasserbad befinden oder aus dem Wasserbad zum Ablesen der Reaktionen entfernt werden, übermäßiges Schütteln vermeiden.
8. Auf Flockenbildung (Agglutination) überprüfen.

Qualitätssicherung durch den Anwender: Bei Anwendung sowohl homologe als auch heterologe Kontrollen einsetzen, um die Leistung des Antiserums, die Techniken und die Methodik zu überprüfen. **Difco** QC Antigens *Salmonella* kann als homologe Kontrolle verwendet werden. Nähere Anweisungen finden Sie auf der Packungsbeilage zu **Difco** QC Antigens *Salmonella*.

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten NCCLS-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

ERGEBNISSE

Objektträgertest

1. Die Ergebnisse werden folgendermaßen abgelesen und dokumentiert:

4+	100%ige Agglutination; Hintergrund klar bis leicht trüb.	1+	25 %ige Agglutination; Hintergrund wolkig.
3+	75 %ige Agglutination; Hintergrund leicht wolkig.	–	Keine Agglutination.
2+	50 %ige Agglutination; Hintergrund mäßig wolkig.		

2. Die positive Kontrolle sollte eine Agglutination des Grades 3+ oder stärker aufweisen.
3. Die negative Kontrolle darf keine Agglutination aufweisen.
4. Bei Testisolaten stellt eine Agglutination des Grades 3+ oder stärker ein positives Ergebnis dar.
5. Eine teilweise (weniger als 3+) oder verzögerte Agglutinationsreaktion ist als negativ zu bewerten.
6. Wenn eine Identifizierung des H-Antigens erforderlich ist, mit dem nächsten Abschnitt fortfahren.

Röhrchentest

1. Die Ergebnisse werden folgendermaßen abgelesen und dokumentiert:

4+	100%ige Agglutination; Hintergrund klar bis leicht trüb.	1+	25%ige Agglutination; Hintergrund wolkig.
3+	75%ige Agglutination; Hintergrund leicht wolkig.	–	Keine Agglutination.
2+	50%ige Agglutination; Hintergrund mäßig wolkig.		

2. Die positive Kontrolle sollte eine Agglutination des Grades 3+ oder stärker in der Routine-Testverdünnung (Routine Test Dilution, RTD) aufweisen.
3. Die negative Kontrolle darf keine Agglutination aufweisen.

Bei Verwendung von **Difco** *Salmonella* H Spicer-Edwards die Ergebnisse mit den Flockenbildungsmustern (Agglutinationsmustern) des Spicer-Edwards-Schemas vergleichen (siehe Tabelle 3, Seite 5).

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

1. Eine vollständige O- und H-Antigen-Charakterisierung eines *Salmonella*-Isolats ist für die endgültige Identifizierung erforderlich. Aufgrund der Komplexität der Laborverfahren reicht eine Identifikation mit polyvalenten Antiseren möglicherweise für die meisten Labors aus.
2. Mögliche *Salmonella*-Isolate mit Inkonsistenzen in den chemischen Reaktionen und O- und H-Antigentests sollten für weitere Tests an ein Referenzlabor gesendet werden.
3. Übermäßige Wärme aus externen Quellen (heiße bakteriologische Öse, Brennerflamme, Lichtquelle o. ä.) kann die glatte Suspension des Mikroorganismus verhindern oder zum Verdunsten oder Ausfällen des Testgemischs führen. Es kann zu falsch positiven Reaktionen kommen.
4. Grobe Kulturisolate sind möglich; sie agglutinieren spontan und führen zur Agglutination bei der negativen Kontrollreaktion (Autoagglutination). Es sind glatte Kolonien zu wählen und mit serologischen Verfahren zu testen.
5. Beim Objektträger-Agglutinationsverfahren zum Testen von O-Antigenen wird das Testen mehrerer Kolonien empfohlen sowie dass nicht absorbierte polyvalente Antiseren verwendet werden, gefolgt von absorbierten Einzelfaktor-Antiseren. Zum Beispiel weisen Kolonien einer 1, 2, 12-Kultur auf einer Agar-Platte wechselnde Anteile von jedem Antigen auf. Das von 1 und 12 absorbierte 1, 2, 12-Antiserum ist hochspezifisch, zeigt jedoch eine schwache oder keine Agglutination bei Kolonien, die einen geringeren Anteil am Antigen 2 und einen höheren Anteil an den Antigenen 1 und 12 haben. Die Verwendung von nicht absorbierten **Difco** *Salmonella* O Antiserum Group A Factors 1, 2, 12 zum Testen mehrerer verdächtiger Kolonien auf einer Platte und der anschließende Test mit absorbiertem **Difco** *Salmonella* O Antiserum Factor 2 gewährleistet das notwendige Gleichgewicht zwischen Sensibilität und Spezifität.
6. Agglutinationsreaktionen von 3+ oder mehr werden als positive Reaktionen gewertet. Kreuzreaktionen, die zu einer Agglutination der Stärke 1+ oder 2+ führen, sind wahrscheinlich, da somatische Antigene von verschiedenen Organismen gemeinsam als Nebengruppen-Antigene benutzt werden.
7. Zwischen einer Vielzahl von *Salmonella*-O-Serogruppen können gemeinsame Antigene vorhanden sein. **Difco** *Salmonella* O Antiserum Poly A enthält u. a. beispielsweise Agglutinine für den Faktor 1, da bei der Immunisierung Kulturen mit dem Faktor 1 verwendet wurden. Es kann erwartet werden, dass dieses polyvalente Antiserum durch das gemeinsame Antigen 1 mit anderen als den in der O-Serogruppe enthaltenen Kulturen A, B, D, E und L reagiert (den Organismen in Gruppe G₁, G₂, H, R, T usw., die den Faktor 1 enthalten).
8. **Difco** *Salmonella* O Antiserum Poly A-I & Vi enthält repräsentativen Mitgliedern dieser somatischen Gruppen vorbereitet und nicht absorbiert. Es ist offensichtlich, dass dieses Serum mit höheren O-Gruppen der *Salmonella* reagieren kann und wird.
9. Die Röhrchen-Agglutinationsmethode wird für H-Antigentests empfohlen, da es zu Kreuzreaktionen mit somatischen Antigenen in den bei der Objektträger-Methode verwendeten Verdünnungen kommen kann.
10. Bei einem Röhrchentest sicherstellen, dass die korrekte Verdünnung für das jeweilige Antiserum vorbereitet wird. Für die einzelnen Antiseren werden eine Vielzahl von Verdünnungen verwendet. Nähere Angaben sind im Abschnitt „**Vorbereitung des Röhrchentests**“ aufgeführt.

LEISTUNGSMERKMALE

Salmonella O Antisera und Salmonella Antiserum Vi: Die Sensibilität von **Difco** *Salmonella* O Antisera und *Salmonella* Antiserum Vi wird durch Nachweis der entsprechenden Reaktivität, wie im Abschnitt „Ergebnisse, Objektträger test“ beschrieben, anhand einer Reihe homologer *Salmonella*-Kulturen bestimmt (siehe Tabelle 4, Seite 10). Die Spezifität wird durch Nachweis der Nichtreaktivität gegenüber nicht-verwandten (heterologen) *Salmonella*-Gruppen bestimmt.

Salmonella H Antisera

Die Sensibilität von **Difco** *Salmonella* H Antisera wird durch Nachweis der entsprechenden Reaktivität, wie im Abschnitt „Ergebnisse, Röhrchentest“ beschrieben, an einer Reihe homologer *Salmonella*-Kulturen bestimmt (siehe Tabelle 5, Seite 11). Die Spezifität wird durch Nachweis der Nichtreaktivität gegenüber nicht-verwandten (heterologen) *Salmonella*-Gruppen bestimmt.

LIEFERBARE PRODUKTE: siehe Seite 12

LITERATUR: S. “References” im englischen Text.

BD Difco Salmonella O Antisera Difco Salmonella H Antisera Difco Salmonella Antiserum Vi

Italiano

USO PREVISTO

Difco *Salmonella* O Antisera sono utilizzati in prove di agglutinazione in vetrino per il riconoscimento della *Salmonella* per mezzo di antigeni somatici (O).

Difco *Salmonella* H Antisera sono utilizzati in prove di agglutinazione in provetta per il riconoscimento della *Salmonella* tramite antigeni flagellati (H).

Difco *Salmonella* Vi Antiserum è utilizzato in prove di agglutinazione in vetrino per il riconoscimento della *Salmonella* Vi.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Le specie *Salmonella* provocano una varietà di disturbi degli esseri umani noti con il nome di salmonellosi. La gamma dei disturbi varia da leggere gastroenteriti auto-limitanti a forme più gravi, con possibilità di batteriemia o febbre tifoide, che possono rivelarsi letali. I disturbi gravi e la batteriemia sono principalmente associati a tre serovar di *S. enterica* ssp. *enterica* (Choleraesuis, Paratyphi A e Typhi), mentre la maggior parte delle oltre 2.300 rimanenti famiglie sono associate a gastroenteriti. La gravità del disturbo diarroico dipende dalla virulenza della famiglia e dalle condizioni del portatore umano.

La *Salmonella* è presente in natura e si manifesta nel tratto intestinale di numerosi animali, sia domestici sia selvatici. Il microorganismo può essere trasmesso all'uomo per contatto ambientale o per inserimento di prodotti alimentari di origine animale o vegetale.

I serovar di *Salmonella* appartengono a due specie: *S. bongori*, che contiene 18 serovar, e *S. enterica*, che contiene gli oltre 2.300 serovar suddivisi in sei sottospecie.^{1,2}

Le sei sottospecie di *S. enterica* sono:

<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> (I o 1)	<i>S. enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> (IIa o 3a)	<i>S. enterica</i> ssp. <i>houtenae</i> (IV o 4)
<i>S. enterica</i> ssp. <i>salamae</i> (II o 2)	<i>S. enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i> (IIb o 3b)	<i>S. enterica</i> ssp. <i>indica</i> (VI o 6)

La nomenclatura e la classificazione di questi batteri cambiano costantemente.³ La *Salmonella* e la prima *Arizona* dovrebbero essere considerati come un singolo gene, *Salmonella*.⁴ Per quanto riguarda i laboratori, si consiglia di riportare i nomi dei serovar di *Salmonella* relativi alle sottospecie *enterica*. I nomi dei serovar non sono più riportati in corsivo e la prima lettera è maiuscola. Per esempio, la famiglia solitamente identificata come *Salmonella typhimurium* attualmente è nota come *Salmonella* Typhimurium.

I serovar di altre sottospecie di *S. enterica* (eccetto alcuni appartenenti alle sottospecie *salamae* e *houtenae*) e quelli di *S. bongori* non hanno denominazione e sono designati per mezzo della loro formula antigenica. Per informazioni recenti sulla nomenclatura, consultare gli opportuni riferimenti.¹⁻¹⁰

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Gli antigeni della *Salmonella* O sono antigeni somatici (O) stabili al calore e sono identificati per primi. L'antigene Vi è un antigene di copertura labile al calore in grado di circondare una parete cellulare e mascherare l'attività dell'antigene somatico. I microorganismi dotati di Antigene Vi non agglutinano in antisiero O. Per determinare l'antigene O di tali culture, è necessario bollire una sospensione dell'organismo per distruggere l'antigene di copertura labile al calore ed effettuare il test con antisieri O. Gli antigeni (H) flagellati sono labili al calore e normalmente sono associati a mobilità.

Non è necessaria una completa caratterizzazione sierologica della *Salmonella* per un rilevamento positivo del microorganismo nei casi in cui questo si manifesta come patogeno. È di primaria importanza osservare le procedure di isolamento adeguate ed i test biochimici differenziali. I possibili isolati di *Salmonella* possono essere identificati presuntivamente con un minimo di identificazione sierologica. Gli isolati possono essere inviati a laboratori che effettuano il livello di prova necessario alla completa identificazione del microorganismo.

Per un'ulteriore discussione dell'identificazione sierologica della *Salmonella*, consultare gli opportuni riferimenti.^{1,3,9,11-14}

L'identificazione delle specie di *Salmonella* comprende l'identificazione biochimica e sierologica. La conferma sierologica include la procedura in cui il microorganismo (antigene) reagisce con l'anticorpo corrispondente. Questa reazione *in vitro* produce grumi macroscopici, un fenomeno chiamato agglutinazione. La reazione tra omologhi desiderata avviene con rapidità, non è dissociante (elevata avidità) ed è fortemente legante (elevata affinità).

Esiste la possibilità di reazioni tra eterologhi, in quanto un microorganismo (antigene) può agglutinare un anticorpo prodotto in risposta ad alcune altre specie. Queste sono caratterizzate da scarsa resistenza e formazione lenta. Simili reazioni, impreviste e, forse, imprevedibili, possono ingenerare confusione nel riconoscimento sierologico. Una reazione di agglutinazione positiva tra omologhi deve essere consistente con l'identificazione morfologica e biochimica del microorganismo.

Nella prova in vetrino l'agglutinazione somatica appare come un consistente grumo granulare. Le reazioni tra omologhi sono rapide e resistenti (3+). Le reazioni tra eterologhi sono deboli e la loro formazione è lenta.

L'agglutinazione degli antigeni flagellati nel test in provetta appare come una flocculazione libera che può essere facilmente risospesa.

REAGENTI

Difco *Salmonella* O, H e Vi Antisera sono antisieri policlonali di coniglio liofilizzati, contenenti circa 0,04% di Timerosal come conservante.

Difco *Salmonella* O Poly Antisera sono antisieri polivalenti. Ogni antisiero è specifico per determinati antigeni del sierogruppo. Se reidratato correttamente e impiegato nel modo prescritto, ogni fiala di **Difco** *Salmonella* O o Vi Antisera contiene una quantità di reagente sufficiente per 60 test. **Difco** *Salmonella* O Poly A-I e Vi Antisera sono preparati con famiglie rappresentative di questi sierogruppi e non sono assorbiti. Possono reagire in maniera incrociata poiché hanno in comune gli antigeni O.

Difco *Salmonella* O Group Antisera sono specifici per i principali fattori presenti nel sierogruppo. **Difco** *Salmonella* O Group Antisera sono specifici per i principali fattori presenti nei singoli sierogruppi. Nell'utilizzare **Difco** *Salmonella* O Group Antisera, l'eventuale presenza di antigeni di gruppi non principali condivisi dai sierogruppi rende possibili reazioni incrociate. **Difco** *Salmonella* O Factor Antisera sono assorbiti in base alla necessità per conferire specificità e praticità ad ogni antisiero senza riduzioni delle reazioni tra omologhi fino ad un livello insoddisfacente.

Difco *Salmonella* H Poly Antisera sono antisieri polivalenti specifici per determinati antigeni flagellati. Ogni fiala di **Difco** *Salmonella* H Antisera contiene reagente sufficiente per effettuare tra i 150 e i 1500 test, secondo l'antisiero impiegato. **Difco** *Salmonella* H Antisera sono assorbiti o non assorbiti specificatamente per antigeni di fase 1 o di fase 2. **Difco** *Salmonella* H Antisera Spicer-Edwards sono antisieri accumulati e polivalenti e antisieri aggiuntivi supplementari per riconoscere gli antigeni H che si manifestano con maggiore frequenza.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

La confezione di questo prodotto contiene gomma naturale secca.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso, sterilizzare in autoclave campioni, contenitori, vetrini, provette e tutti gli altri materiali contaminati. Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.

Conservazione: Conservare gli antisieri **Difco** *Salmonella* O, H e Vi liofilizzati e reidratati a 2 – 8 °C.

L'esposizione prolungata dei reagenti a temperature diverse da quelle indicate può danneggiare i prodotti.

Deterioramento del prodotto: La data di scadenza si riferisce al prodotto nel contenitore intatto e conservato come prescritto. Non usare il prodotto se appare indurito, scolorito o presenta altri segni di deterioramento.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Accuratezza clinica: è possibile rintracciare la *Salmonella* su diversi supporti selettivi come Hektoen Enteric Agar o XLD Agar. Per specifiche informazioni, consultare gli opportuni riferimenti.^{11,12} Stabilire che la cultura del microorganismo sia pura e che le reazioni biochimiche siano coerenti con l'identificazione dell'organismo come appartenente alle specie *Salmonella*. Una volta soddisfatti questi criteri è possibile eseguire l'identificazione sierologica.

Campioni alimentari: è possibile rintracciare la *Salmonella* nel caso in cui i campioni siano lavorati per recuperare microorganismi lesionati e per impedire lo sviluppo eccessivo di microorganismi concorrenti. Per suggerimenti sulle procedure di isolamento della *Salmonella* dai cibi, consultare gli opportuni riferimenti.^{13,14} Stabilire che la cultura del microorganismo sia pura e che le reazioni biochimiche siano coerenti con l'identificazione dell'organismo come appartenente alle specie *Salmonella*. Una volta soddisfatti questi criteri è possibile eseguire l'identificazione sierologica.

Per l'analisi sierologica dell'isolato occorre effettuare una subcoltura da un terreno selettivo ad un agar non selettivo.

PROCEDURA

Materiali forniti: **Difco** *Salmonella* O Antisera; **Difco** *Salmonella* H Antisera; o **Difco** *Salmonella* Antiserum Vi.

Materiali necessari ma non forniti: Test su vetrino Soluzione sterile allo 0,85% di NaCl, vetrini di agglutinazione di 6,45 cm², stick di applicazione, bagnomaria bollente, centrifuga.

Test in provetta: Soluzione sterile allo 0,85% di NaCl; provette di coltura da 12 x 75 mm, con relativo rack; bagnomaria a 50 ± 2 °C; pipette sierologiche da 1 mL; formaldeide.

Preparazione dei reagenti: Prima di eseguire le analisi, lasciare equilibrare tutti i materiali a temperatura ambiente. Assicurarsi che tutta la vetreria e le pipette siano pulite e prive di residui di detergenti o altro.

Per costituire, aggiungere 3 mL di soluzione sterile allo 0,85% di NaCl e roteare leggermente per dissolvere completamente il contenuto. Gli antisieri ricostituiti sono considerati una soluzione di lavoro 1:2.

Test di agglutinazione dell'isolato

1. Dalla coltura su supporto non selettivo, prelevare con un'ansa un'aliquota di crescita, trasferirla su una goccia di soluzione fisiologica sterile allo 0,85% su un vetrino pulito ed emulsificare l'organismo.

2. Roteare la piastra per 1 min e poi osservare l'agglutinazione.
3. Se si verifica agglutinazione (autoagglutinazione), la coltura è disomogenea e non può essere analizzata. Eseguire una subcoltura su agar non selettivo, incubare e testare di nuovo l'organismo come descritto nei passaggi 1 e 2.
4. Se l'agglutinazione non si verifica, procedere con il test sull'organismo.

Sceita degli antisieri

Salmonella O Antisera: Il presente Schema I per l'identificazione sierologica (Vedere Tabella 1 a seguito) inizia con Difco Salmonella O Antisera Poly A fino a Poly G, i quali contengono:

Salmonella Group Antisera	Gruppi somatici presenti
Salmonella O Antiserum Poly A	A,B,D,E ₁ (E ₂ ,E ₃) *, E ₄ ,L
Salmonella O Antiserum Poly B	C ₁ ,C ₂ ,F,G,H
Salmonella O Antiserum Poly C	I,J,K,M,N,O
Salmonella O Antiserum Poly D	P,Q,R,S,T,U
Salmonella O Antiserum Poly E	V,W,X,Y,Z
Salmonella O Antiserum Poly F	51-55
Salmonella O Antiserum Poly G	56-61

*Le famiglie dei gruppi E₂ ed E₃ sono lisogenizzate dal fago 15 e successivamente dal fago 34. Queste famiglie sono ora classificate nel gruppo E₁.²

In caso di agglutinazione, utilizzare il singolo **Difco** Salmonella O Group Antisera per determinare il sierogruppo specifico al quale appartiene l'isolato. Per ragioni di efficacia, effettuare il test prima con i singoli **Difco** Salmonella O Group Antisera B, D e C₁ (i sierogruppi più diffusi).

Se non si verifica agglutinazione con Poly A o B, effettuare il test sull'isolato con **Difco** Salmonella Antiserum Vi. In caso di risultato positivo, riscaldare ed effettuare nuovamente il test con **Difco** Salmonella Antiserum Vi. In caso di agglutinazione dopo la bollitura con **Difco** Salmonella Antiserum Vi, l'isolato probabilmente non è *Salmonella*. Se, dopo la bollitura, non si verifica agglutinazione con **Difco** Salmonella Antiserum Vi, effettuare il test sulla coltura bollita con il **Difco** Salmonella O Antisera singolo. Se i risultati del test non sono determinati, è necessario inviare l'isolato ad un laboratorio di riferimento per le prove supplementari.

Se non si verifica agglutinazione con Poly C, D, E, F e G, l'isolato probabilmente non è *Salmonella*.

Tabella 1. – Schema I per l'utilizzo di Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F e G.

Prova con	Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F e G				
Risultati di prova	+	– con Poly A o B			– con Poly C, D, E, F e G
Prova con	Salmonella O Antisera individuali	Salmonella O Antiserum Vi			
Risultati di prova	+ con un Salmonella O Antiserum (necessario)	+	–		
Prova con		Riscaldamento e ripetizione della prova con Salmonella O Antiserum Vi			
Risultati di prova		+	–		
Conclusione del test per l'azione successiva	Determinare Salmonella H Antigen	Verificare che l'isolato non sia una <i>Salmonella</i>	Effettuare il test sulla coltura bollita con Salmonella O Antisera individuali	Verificare che l'isolato non sia una <i>Salmonella</i>	Verificare che l'isolato non sia una <i>Salmonella</i>

Salmonella O Antiserum Poly A-I e Vi Schema II (Vedere Tabella 2 a seguito): Questo antisiero rileva i fattori 1-16, 19, 22-25, 34 e Vi. Tale combinazione di fattori rappresenta i Gruppi A-I e gli antigeni Vi più frequentemente isolati, ed è utilizzato per ricercare possibili isolati di *Salmonella*.

Una reazione positiva indica che è necessario effettuare ulteriori prove sierologiche per identificare l'isolato utilizzando **Difco** Salmonella O Group Antisera. I sierogruppi più diffusi sono B, D e C₁. Per ragioni di efficacia, per questi sierogruppi utilizzare prima **Difco** Salmonella O Group Antisera.

Se l'isolato è positivo al **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I e Vi ma è negativo all'antisiero somatico specifico, effettuare il test sull'isolato con **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Se positivo al **Difco** Salmonella Antiserum Vi, riscaldare e ripetere il test al **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Se positivo al **Difco** Salmonella Antiserum Vi dopo la bollitura, l'isolato probabilmente non è *Salmonella*. Se, dopo la bollitura, non si verifica agglutinazione con **Difco** Salmonella Antiserum Vi, effettuare il test sulla coltura bollita con il **Difco** Salmonella O Antisera singolo. Se i risultati del test non sono determinati, è necessario inviare l'isolato ad un laboratorio di riferimento per le prove supplementari.

Una reazione negativa al **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I e Vi indica che l'isolato non appartiene ai sierogruppi A-I. Se le reazioni biochimiche sono compatibili alla *Salmonella*, è possibile che si tratti di un sierogruppo diverso da A-I. E' necessario effettuare ulteriori test con antisieri per antigeni di altri sierogruppi.

Tabella 2. – Schema II per l'utilizzo di Salmonella O Antiserum Poly A-I e Vi.

Prova con	Salmonella O Antiserum Poly A-I e Vi				
Risultati di prova	+				−
Prova con	Salmonella O Antisera individuali				
Risultati di prova	+	−			
Prova con		Salmonella O Antiserum Vi			
Risultati di prova		+		−	
Prova con		Riscaldamento e ripetizione della prova con Salmonella O Antiserum Vi			
Risultati di prova		+	−		
Conclusione del test per l'azione successiva	Determinare Salmonella H Antigen	Verificare che l'isolato non sia una <i>Salmonella</i>	Effettuare il test sulla coltura bollita con Salmonella O Antisera individuali	Verificare che l'isolato non sia una <i>Salmonella</i>	È possibile che si tratti di una <i>Salmonella</i> rilevabile con l'impiego di Salmonella O Antisera Poly C, D, E, F o G

Salmonella O Group Factor e Single Factor Antisera: Utilizzare il **Difco** Salmonella O Group Antisera selezionato per l'ulteriore identificazione degli isolati. Tra sierogruppi che condividono antigeni O sono possibili reazioni incrociate. Considerare come esempio il seguente elenco parziale di **Difco** Salmonella O Group Antisera.

Salmonella O Antiserum Group A Factors 1, 2, 12; Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 5, 12; Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 12, 27

I Fattori 1 e 12 si manifestano in combinazione con altri antigeni e possono dar luogo a reazioni incrociate. La resistenza delle reazioni sarà d'aiuto nell'interpretazione. L'agglutinazione di 3+ o superiore con formazione rapida indica una reazione tra omologhi.

Impiegare i **Difco** Salmonella O Factor Antisera selezionati. Gli antisieri assorbiti specifici per un antigene identificabile in un dato sierogruppo sono utilizzati per identificare ulteriormente l'isolato. Nell'esempio sopra riportato, è possibile utilizzare **Difco** Salmonella O Factor Antisera.

Salmonella O Antiserum Factor 2; Salmonella O Antiserum Factor 4; Salmonella O Antiserum Factors 4, 5; Salmonella O Antiserum Factor 5

Polyvalent Salmonella H Antisera: L'ulteriore identificazione di un isolato di *Salmonella* comporta la caratterizzazione degli antigeni flagellati. La definizione dei sierogruppi è possibile con i seguenti **Difco** Polyvalent H Antisera.

Salmonella H Poly Group Antisera	Flagellar Antigens Present
Salmonella H Antiserum Poly a-z	Gruppi EN,G,L,Z ₄ , complessi 1 e a-k,r-z,Z ₆ ,Z ₁₀ ,Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly A	Gruppi a,b,c,d,i,Z ₁₀ ,Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly B	Gruppi eh,en,enx,enx ₁₅ , complesso G
Salmonella H Antiserum Poly C	Gruppi k,l,r,y,z,Z ₄
Salmonella H Antiserum Poly D	Gruppi Z ₃₅ ,Z ₃₆ ,Z ₃₇ ,Z ₃₈ ,Z ₃₉ ,Z ₄₁ ,Z ₄₂
Salmonella H Antiserum Poly E	Complesso 1, Z ₆

È possibile utilizzare antisieri H assorbiti specifici per singoli antigeni o per un complesso di antigeni per identificare ulteriormente l'isolato.

Salmonella H Antisera assorbiti e non assorbiti: La completa identificazione di un isolato di *Salmonella* comporta l'analisi di antigeni di fase 1 e fase 2 utilizzando l'antisiero.H Per un modello complesso delle analisi e delle procedure, consultare gli opportuni riferimenti.⁹

Salmonella H Antisera Spicer-Edwards: **Difco** Salmonella H Antisera Spicer-Edwards è utilizzato per ricercare e identificare le *Salmonella* più comunemente riscontrate utilizzando una combinazione di antisieri polivalenti e di complesso singolo.

Tabella 3. – Identificazione di Salmonella H utilizzando Salmonella H Antisera Spicer-Edwards.

H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards			
	1	2	3	4		1	2	3	4
a	+	+	+	–	k	–	+	+	+
b	+	+	–	+	r	–	+	–	+
c	+	+	–	–	y	–	+	–	–
d	+	–	+	+	z	–	–	+	+
e,h	+	–	+	–	Z₄ Complex**	–	–	+	–
G Complex*	+	–	–	+	Z₁₀	–	–	–	+
i	+	–	–	–	Z₂₉	–	+	+	–

*Il componente complesso G della Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1 e 4 reagisce con gli f,g; f,g,s; f,g,t; g,m; g,m,q; g,m,s; g,m,s,t; g,m,t; g,p; g,p,s; g,p,u; g,q; g,s,t; g,t; m,p,t,u e m,t.

**Il componente complesso Z₄ reagisce con Z₄,Z₂₃; Z₄,Z₂₄ e Z₄,Z₂₂.

Osservare che nessun antigene sia positivo con tutti i quattro Salmonella H Antisera Spicer-Edwards. È necessario verificare l'uniformità di qualsiasi antigene che reagisca con tutti e quattro i sieri.

Procedura del test su vetrino

Salmonella O e Vi Antisera

Utilizzare la seguente procedura per testare l'isolato con ciascun antisiero selezionato.

- Dispensare su una piastra di agglutinazione 1 goccia (35 µL) dell'antisiero da analizzare.
- Da un terreno agar solido, trasferire una parte di un'aliquota di una colonia isolata sull'area di reazione di cui sopra e miscelare completamente.
- Controllo negativo:** Dispensare 1 goccia di soluzione sterile allo 0,85% di NaCl su una piastra di agglutinazione. Aggiungere 1 goccia di **Difco** Salmonella O Antiserum da analizzare su una piastra di agglutinazione e miscelare completamente.
- Controllo positivo:** Dispensare su una piastra di agglutinazione 1 goccia di **Difco** Salmonella O Antiserum da analizzare. Aggiungere 1 goccia di un **Difco** QC Antigen Salmonella adatto o di colture di provvista di identificazione sierologica nota.
- Roteare la piastra per 1 min e poi leggere il risultato di agglutinazione. È necessario leggere i risultati entro 1 min.

Preparazione del test in provetta

- Soluzione fisiologica formalinizzata allo 0,6%:** Preparare aggiungendo 6 mL di formaldeide per 1000 mL di soluzione sterile allo 0,85% di NaCl.
- Organismo di prova:** Spesso è necessario aumentare la mobilità dell'organismo di prova. A tale scopo, effettuare diversi trasferimenti consecutivi in Motility GI Medium.
 - Inoculare delicatamente in provetta sotto la superficie del supporto utilizzando il metodo a infissione.
 - Incubare a 35 – 37 °C per 18 – 20 h.
 - Trasferire solo gli organismi migrati verso il fondo della provetta.
 - Se l'organismo si sposta di 50 – 60 mm nel supporto in 18 – 20 h, è pronto per l'uso.
 - Si consiglia un brodo di infusione come Veal Infusion Broth per la coltivazione di *Salmonella* mobile prima del test. Dovrebbe essere inoculato ed incubato a 35 °C per 24 h. Per l'incubazione a 35 °C per 4 – 6 h è possibile utilizzare Brodo d'infusione cardio-cerebrale. Se si utilizza Brodo di Soia triptica, incubare a 35 °C per 24 h.
 - Preparare la sospensone dell'organismo di prova utilizzando volumi equivalenti di coltura in brodo a soluzione fisiologica formalinizzata allo 0,6%. La densità finale di questa sospensione di prova dovrà essere pari a quella del McFarland Turbidity Standard n. 3.
- Controllo positivo:** In commercio, non esistono antigeni H di Salmonella QC preparati. L'utente dovrà avere a disposizione colture di provvista di identificazione sierologica nota da utilizzare nel controllo qualità. Preparare l'antigene utilizzando sierotipi noti e seguendo la procedura illustrata sopra. (Vedere sopra, **Organismo di prova**).
- Salmonella H Antisera:** Gli antisieri ricostituiti sono considerati una soluzione di lavoro 1:2. Preparare le soluzioni nel modo qui indicato e utilizzare il giorno stabilito. Eliminare le aliquote non utilizzate.
 - Per la maggior parte di **Salmonella H Antisera:** Preparare una soluzione 1:250 aggiungendo 0,1 mL di antisiero ricostituito a 25 mL di soluzione allo 0,85% di NaCl. Dopo aver miscelato uguali quantità (0,5 mL) di antisiero diluito ed isolato di prova, il rapporto di diluizione finale dovrà essere di 1:1.000.
 - Salmonella H Antisera x, z₁₃, z₁₅ e z₂₈:** Preparare una soluzione 1:125 aggiungendo 0,1 mL di antisiero ricostituito a 12,5 mL di soluzione allo 0,85% di NaCl. Dopo aver miscelato uguali quantità (0,5 mL) di antisiero diluito ed isolato di prova, il rapporto di diluizione finale dovrà essere di 1:500.
 - Salmonella H Antiserum Poly a-z:** Preparare una soluzione 1:25 aggiungendo 0,1 mL di antisiero ricostituito a 2,5 mL di soluzione allo 0,85% di NaCl. Dopo aver miscelato uguali quantità (0,5 mL) di antisiero diluito ed isolato di prova, il rapporto di diluizione finale dovrà essere di 1:100.

Procedura del test in provetta

Salmonella H Antisera

- Preparare una provetta da 12 x 75 mm per ogni organismo da testare.
- Antisiero diluito:** Dispensare 0,5 mL in ogni provetta.
- Isolato di prova:** Aggiungere 0,5 mL in una provetta adatta.
- Controllo positivo:** Aggiungere 0,5 mL di controllo positivo dell'antigene in una provetta contenente 0,5 mL di antisiero.
- Controllo negativo:** Aggiungere 0,5 mL di soluzione allo 0,85% di NaCl contenente 0,5 mL di isolato di prova.
- Incubare tutte le provette a bagnomaria a 50 ± 2 °C per 1 h.
- Verificare la flocculazione (agglutinazione).
- Ripetere il test in provetta utilizzando un organismo di prova di fase inversa. (Vedere la procedura di **Inversione di fase** sotto riportata).

Inversione di fase

- Preparare il supporto di inversione di fase Motility GI Medium seguendo le istruzioni.
- Preparare l'antisiero opposto alla fase desiderata. Per esempio, l'incubazione di *Salmonella* Typhimurium fase 1[i] in GI Motility Medium contenente antisiero i consente la crescita e la diffusione di S. Typhimurium fase 2 [1,2].
- Aggiungere 1 mL di una soluzione 1:10 di antisiero a 25 mL di GI Motility Medium sterile e miscelare bene. Versare su di una piastra di Petri sterile e far solidificare.
- Inoculare perforando la sommità del supporto solidificato.
- Incubare a 35 – 37 °C per 24 h.
- Trasferire la crescita dalla sommità di diffusione opposta al sito di inoculazione ad un supporto liquido per effettuare il test secondo le fasi previste da **Procedura del test in provetta – Salmonella H Antisera**
- Se la mobilità non è accettabile, ripassare in Motility GI Medium.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards

- Preparare l'organismo di prova e la soluzione 1:2 di antisiero come descritto sopra in Preparazione del test in provetta
- Diluizione finale 1:1.000 di antisiero:** Preparare aggiungendo 0,1 mL di antisiero ricostituito (diluizione di lavoro 1:2) a 25 mL di soluzione allo 0,85% di NaCl.
- Preparare 4 provette di colture (12 x 75 mm) per ogni organismo di prova.
- Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1-4:** Aggiungere 0,5 mL dell'antisiero diluito alle provette di coltura.
- Organismo di prova:** Dispensare 0,5 mL in ogni provetta.
- Incubare tutte le provette a bagnomaria a 50 ± 2 °C per 1 h.
- Rimuovere dal bagnomaria. Evitare di agitare eccessivamente le provette quando sono a bagnomaria o quando vengono rimosse dal bagnomaria prima di verificare le reazioni.
- Verificare la flocculazione (agglutinazione).

Controllo di qualità a cura dell'utente: Al momento dell'uso, applicare entrambi i controlli per omologhi ed eterologhi per verificare le prestazioni dell'antisiero, le tecniche e la metodologia. **Difco** QC Antigeni Salmonella può essere utilizzato come controllo per omologhi. Per ulteriori informazioni, consultare l'allegato nella confezione di **Difco** QC Antigeni Salmonella.

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione NCCLS in merito.

RISULTATI

Test su vetrino

- Leggere e registrare i risultati come segue.

4+	100% di agglutinazione (sfondo da trasparente a leggermente appannato).	1+	25% di agglutinazione (sfondo torbido).
3+	75% di agglutinazione (sfondo leggermente torbido).	–	Nessuna agglutinazione.
2+	50% di agglutinazione (sfondo moderatamente torbido).		

2. El controllo positivo deve fornire un risultato di agglutinazione pari a 3+ o superiore.
3. Il controllo negativo non deve evidenziare alcuna agglutinazione.
4. Per il test degli isolati, si considera positivo un risultato di agglutinazione pari a 3+ o superiore.
5. Una reazione parziale (minore di 3+) o ritardata, si considera un risultato negativo.
6. Nel caso in cui si renda necessaria l'identificazione di un antigene H, procedere alla sezione seguente.

Test in provetta

1. Leggere e registrare i risultati come segue.

4+	100% di agglutinazione (sfondo da trasparente a leggermente appannato).	1+	25% di agglutinazione (sfondo torbido).
3+	75% di agglutinazione (sfondo leggermente torbido).	–	Nessuna agglutinazione.
2+	50% di agglutinazione (sfondo moderatamente torbido).		

2. Il controllo positivo deve fornire un risultato di agglutinazione pari a 3+ o superiore a diluizione di prova di routine (RTD).
3. Il controllo negativo non deve evidenziare alcuna agglutinazione.

Nell'utilizzare **Difco** Salmonella H Spicer-Edwards, confrontare i risultati con i modelli di flocculazione (agglutinazione) relativi allo schema di Spicer-Edwards (Vedere Tabella 3, pagina 7).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Per l'identificazione finale di un isolato di *Salmonella* è necessaria la completa caratterizzazione degli antigeni O e H. Per la complessità delle procedure di laboratorio, per molti laboratori può essere sufficiente l'identificazione con antisieri polivalenti.
2. Eventuali isolati di *Salmonella* incompatibili con le reazioni biochimiche e le prove con antigeni O e H dovranno essere inviati a laboratori di riferimento per ulteriori test.
3. Il calore eccessivo da fonti esterne (ansa batteriologica calda, fiamma di bruciatore, fonte di luce, ecc.) può impedire la formazione di una sospensione omogenea del microorganismo o causare evaporazione o precipitazione della miscela da testare e dar luogo a reazioni falsamente positive.
4. Le colture disomogenee di isolati sono soggette ad agglutinazione spontanea con conseguente agglutinazione della reazione del controllo negativo (autoagglutinazione). Le colture omogenee devono essere selezionate e testate in procedure sierologiche.
5. Nella procedura di agglutinazione su vetrino per il test con antigene O, è consigliabile analizzare diverse colonie e utilizzare antisieri polivalenti non assorbiti seguiti da antisieri assorbiti a fattore singolo. Per esempio, colonie di una coltura da 1,2,12 su piastra di agar presenteranno vari gradi di ogni antigene. Un antisiero da 1,2,12 assorbito degli anticorpi 1 e 12 sarà altamente specifico ma sarà caratterizzato da agglutinazione scarsa o assente con colonie aventi minori quantità di antigeni 2 e maggiori quantità di antigeni 1 e 12. Utilizzando **Difco** Salmonella O Antiserum Group A Factors 1,2,12 non assorbito, per analizzare colonie sospese su una piastra e analizzando successivamente con **Difco** Salmonella O Antiserum Factor 2, si ottiene il necessario bilanciamento di sensibilità e specificità.
6. Le reazioni di agglutinazione di 3+ o superiori sono da interpretare come reazioni positive. Reazioni incrociate prodotte in agglutinzioni da 1+ o 2+ sono probabili a causa degli antigeni somatici, nonché di antigeni di gruppi non principali, condivisi da gruppi differenti.
7. Possono esistere antigeni comuni tra vari sierogruppi "O" di *Salmonella*. Per esempio, **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A contiene, tra l'altro, agglutinine per il fattore 1, in quanto le colture in possesso del fattore 1 erano impiegate per l'immunizzazione. È possibile prevedere che tale antisiero polivalente reagirà con colture diverse da quelle contenute nei sierogruppi "O" A, B, D, E ed L a causa dell'antigene 1 in comune (gli organismi nei Gruppi G₁, G₂, H, R, T, ecc., che contengono il fattore 1).
8. **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi è stato preparato con elementi rappresentativi di quei gruppi somatici e non è stato assorbito. È ovvio che questo siero è in grado di reagire, e reagirà, con i gruppi O più elevati di *Salmonella*.
9. La tecnica di agglutinazione in provetta è consigliata per il test con l'antigene H per la possibilità che si verifichino reazioni incrociate con antigeni somatici alle diluizioni utilizzate nella tecnica su vetrino.
10. Nel test in provetta, assicurarsi che sia preparata la corretta diluizione per lo specifico antisiero. Per i vari antisieri si utilizzano varie diluizioni. Consultare la sezione **Preparazione del test in provetta** per ulteriori particolari.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Salmonella O Antisera e Salmonella Antiserum Vi: La sensibilità di **Difco** Salmonella O Antisera e Salmonella Antiserum Vi viene determinata dimostrando l'opportuna reattività, come indicato nei Risultati, sezione Test su vetrino, con un batterio di colture omologhe di *Salmonella* (Vedere Tabella 4, pagina 10). La specificità è determinata dimostrando la non reattività con gruppi non legati alla *Salmonella* (eterologhi).

Salmonella H Antisera

La sensibilità di **Difco** Salmonella H Antisera viene determinata dimostrando l'opportuna reattività, come indicato nei Risultati, sezione Test su vetrino, con un batterio di colture omologhe di *Salmonella* (Vedere Tabella 5, pagina 11). La specificità è determinata dimostrando la non reattività con gruppi non legati alla *Salmonella* (eterologhi).

DISPONIBILITÀ: vedere pagina 12

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

BD Difco Salmonella O Antisera Difco Salmonella H Antisera Difco Salmonella Antiserum Vi

Español

USO PREVISTO

Difco Salmonella O Antisera (antisueros para *Salmonella* O **Difco**) se utilizan en las pruebas de aglutinación en portaobjetos para la identificación de *Salmonella* mediante antígenos somáticos (O).

Difco Salmonella H Antisera (antisueros para *Salmonella* H **Difco**) se utilizan en las pruebas de aglutinación en tubo para la identificación de *Salmonella* mediante antígenos flagelares (H).

Difco Salmonella Vi Antiserum (antisuero para *Salmonella* Vi **Difco**) se utiliza en las pruebas de aglutinación en portaobjetos para la identificación de *Salmonella* Vi.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La especie *Salmonella* causa diversas enfermedades humanas llamadas salmonelosis. La enfermedad puede variar desde gastroenteritis leve de remisión espontánea hasta formas más graves, posiblemente con bacteriemia o fiebre tifoidea, que pueden poner en peligro la vida. La enfermedad grave y la bacteriemia se asocian principalmente con tres serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica* (Choleraesuis, Paratyphi A y Typhi), mientras que las otras 2.300 o más cepas se asocian con gastroenteritis. Con la gravedad de la enfermedad diarreica depende de la virulencia de la cepa y de la salud del anfitrión humano.

Salmonella se puede encontrar en otros seres vivos y se detecta en el intestino de muchos animales, tanto salvajes como domésticos. El microorganismo puede llegar al ser humano por contacto con el entorno o al ingerir carne roja o productos alimentarios de origen vegetal.

Todos los serotipos de *Salmonella* pertenecen a dos especies: *S. bongori*, que incluye 18 serotipos, y *S. enterica*, que incluye los restantes 2.300 o más serotipos divididos en seis subespecies^{1,2}.

Las seis subespecies de *S. enterica* son las siguientes:

<i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i> (I o 1)	<i>S. enterica</i> subespecie <i>arizonae</i> (IIIa o 3a)	<i>S. enterica</i> subespecie <i>houtenae</i> (IV o 4)
<i>S. enterica</i> subespecie <i>salmatae</i> (II o 2)	<i>S. enterica</i> subespecie <i>diarizonae</i> (IIIb o 3b)	<i>S. enterica</i> subespecie <i>indica</i> (VI o 6)

La nomenclatura y clasificación de dichas bacterias cambian constantemente³. *Salmonella* y la antigua *Arizona* deben considerarse del mismo género, *Salmonella* ⁴. Se recomienda que los laboratorios informen los nombres de los serotipos de *Salmonella* para la subespecie *enterica*. Los nombres de serotipos ya no se escriben en cursivas y la primera letra debe ser mayúscula. Por ejemplo, la cepa que solía identificarse como *Salmonella typhimurium* ahora se conoce como *Salmonella* Typhimurium.

Los serotipos de otras subespecies de *S. enterica* (excepto algunas de las subespecies *salmatae* y *houtenae*) y las de *S. bongori* no tienen nombre y se designan por su fórmula antigénica. Para obtener la información más reciente de nomenclatura, consultar las referencias correspondientes¹⁻¹⁰.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los antígenos *Salmonella* O son antígenos somáticos (O) termoestables y se identifican primero. El antígeno Vi es un antígeno de envoltura termolábil que puede rodear a la pared celular y enmascarar la actividad del antígeno somático. Los microorganismos con el antígeno Vi no se aglutinan en antisueros O. Para determinar el antígeno O de dichos cultivos, se debe hervir una suspensión del organismo para destruir el antígeno de envoltura termolábil y luego analizarse con antisueros O. Los antígenos flagelares (H) son termolábiles y por lo general se asocian con la movilidad.

No se requiere una caracterización serológica completa de *Salmonella* para una detección satisfactoria del microorganismo cuando éste es patógeno. El uso de procedimientos de aislamiento adecuados y pruebas bioquímicas de diferenciación son de suma importancia. Los aislados posibles de *Salmonella* pueden identificarse de manera presuntiva con una identificación serológica mínima. Los aislados pueden enviarse a laboratorios que determinen el nivel de análisis necesario para completar la identificación del microorganismo.

Para obtener más información acerca de la identificación serológica de *Salmonella*, consultar las referencias correspondientes^{1-3,9,11-14}.

La identificación de la especie *Salmonella* incluye identificación tanto bioquímica como serológica. En el procedimiento de confirmación serológica, se produce una reacción en la que el microorganismo (antígeno) reacciona con el anticuerpo correspondiente. Esta reacción *in vitro* produce la formación de grumos macroscópicos denominada aglutinación. La reacción homóloga deseada es rápida, de unión fuerte (alta afinidad) y no disociativa (alta avidez).

Dado que un microorganismo (antígeno) puede aglutinarse con un anticuerpo producido como respuesta a alguna otra especie, son posibles las reacciones heterólogas. Éstas se caracterizan por ser débiles y de lenta formación. Dichas reacciones imprevistas y posiblemente impredecibles pueden causar confusión en la identificación serológica. Por consiguiente, una reacción de aglutinación homóloga positiva debería apoyar la identificación morfológica y bioquímica del microorganismo.

La aglutinación del antígeno somático en la prueba de portaobjetos aparece como una aglutinación granular firme. Las reacciones homólogas son fuertes y rápidas (3+). Las reacciones heterólogas son débiles y lentas.

La aglutinación de antígenos flagelares en la prueba en tubo aparece como una floculación no firme que puede suspenderse nuevamente con facilidad.

REACTIVOS

Difco Salmonella O Antisera, **Difco** Salmonella H Antisera y **Difco** Salmonella Vi Antisera son antisueros de conejo policlonales liofilizados que contienen aproximadamente un 0,04% de timerosal como conservante.

Difco Salmonella O Poly Antisera son antisueros polivalentes. Cada antisuero es específico para determinados antígenos de serogrupo. Cuando se rehidrata correctamente y utiliza de la manera recomendada, cada frasco de **Difco** Salmonella O Group Antisera, es posible que se produzcan reacciones cruzadas porque los serogrupos pueden tener en común antígenos de grupos secundarios. **Difco** Salmonella O Factor Antisera son absorbidos según la necesidad, lo que convierte a cada antisuero en tan específico como práctico, sin reducir las reacciones homólogas a un nivel no satisfactorio.

Difco Salmonella O Group Antisera son específicos para los factores principales presentes en el serogrupo. **Difco** Salmonella O Factor Antisera son específicos para los factores de los serogrupos individuales. Al utilizar **Difco** Salmonella O Group Antisera, es posible que se produzcan reacciones cruzadas porque los serogrupos pueden tener en común antígenos de grupos secundarios. **Difco** Salmonella O Factor Antisera son absorbidos según la necesidad, lo que convierte a cada antisuero en tan específico como práctico, sin reducir las reacciones homólogas a un nivel no satisfactorio.

Difco Salmonella H Poly Antisera son antisueros polivalentes específicos para determinados antígenos flagelares. Cada frasco de **Difco** Salmonella H Antisera contiene suficiente reactivo para realizar 150 – 1500 pruebas, según el antisuero utilizado. **Difco** Salmonella H Antisera son absorbidos o no, de manera específica, para los antígenos de fase 1 o 2. **Difco** Salmonella H Antisera Spicer-Edwards son antisueros polivalentes combinados y antisueros complementarios adicionales para la identificación de los antígenos H más frecuentes.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

El envase de este producto contiene goma natural seca.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Después del uso, se deberán esterilizar muestras, envases, portaobjetos, tubos y demás material contaminado en autoclave. Es necesario seguir al pie de la letra las instrucciones de uso.

Conservación: Conservar **Difco** Salmonella O Antisera, **Difco** Salmonella H Antisera y **Difco** Salmonella Vi Antisera, liofilizados y rehidratados, a una temperatura de 2 – 8 °C.

Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.

Deterioro del producto: La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada. No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras clínicas: *Salmonella* puede recuperarse de medios de diferenciación selectivos tales como el agar entérico Hektoen o agar XLD. Consultar las referencias correspondientes para obtener recomendaciones específicas^{11,12}. Determinar que se haya obtenido un cultivo puro del microorganismo y que las reacciones de las pruebas bioquímicas sean acordes con la identificación del organismo como perteneciente a la especie *Salmonella*. Una vez satisfechos estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.

Muestras de alimentos: Puede recuperarse *Salmonella* de diversos tipos de muestras cuando éstas se procesan para recuperar microorganismos lesionados y evitar el crecimiento excesivo de microorganismos competidores. Consultar las referencias correspondientes para obtener recomendaciones específicas acerca de los procedimientos para aislar *Salmonella* de los alimentos^{13,14}. Determinar que se haya obtenido un cultivo puro del microorganismo y que las reacciones de las pruebas bioquímicas sean coherentes con la identificación del organismo como perteneciente a la especie *Salmonella*. Una vez satisfechos estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.

Se debe realizar un subcultivo de la cepa aislada para las pruebas serológicas desde medios selectivos a un agar no selectivo.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: **Difco** Salmonella O Antisera; **Difco** Salmonella H Antisera; o **Difco** Salmonella Antiserum Vi.

Materiales necesarios pero no suministrados: **Prueba en portaobjetos:** solución de NaCl al 0,85% estéril; portaobjetos de aglutinación con 6,54 cm²; aplicadores; baño María (hirviendo); centrifugadora.

Tubo de ensayo: solución de NaCl al 0,85% estéril; tubos de cultivo de 12 x 75 mm y gradilla; baño María, 50 ± 2 °C; pipetas serológicas de 1 mL; formaldehído.

Preparación del reactivo: Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente antes de realizar las pruebas. Asegurarse de que el material de vidrio y las pipetas estén limpios y libres de residuos, como, por ejemplo, detergente.

Para reconstituir el producto, añadir 3 mL de solución de NaCl al 0,85% estéril y girar suavemente para disolver el contenido por completo. Los antisueros reconstituidos se consideran como diluciones 1:2.

Análisis de la cepa aislada para determinar la autoaglutinación

1. A partir de un cultivo de prueba en medio no selectivo, transferir un asa llena de crecimiento a una gota de solución salina estéril al 0,85% en un portaobjetos limpio, y emulsionar el organismo.
2. Girar el portaobjetos durante 1 min y luego observar para determinar si se ha producido aglutinación.
3. Si ocurre la aglutinación (autoaglutinación), el cultivo es rugoso y no se podrá analizar. Realizar un subcultivo en agar no selectivo, incubarlo y volver a analizar el organismo tal como se describe en los pasos 1 y 2.
4. Si no ocurre ningún tipo de aglutinación, realizar el análisis del organismo.

Selección de antisueros

Salmonella O Antisera: Este Esquema I de identificación serológica (véase la Tabla 1, página 9) comienza con **Difco** Salmonella O Antisera Poly A hasta Poly G, que incluye lo siguiente:

Antisueros de grupo <i>Salmonella</i>	Grupos somáticos presentes
Salmonella O Antiserum Poly A	A,B,D,E ₁ (E ₂ ,E ₃) *, E ₆ ,L
Salmonella O Antiserum Poly B	C ₁ ,C ₂ ,F,G,H
Salmonella O Antiserum Poly C	I,J,K,M,N,O
Salmonella O Antiserum Poly D	P,Q,R,S,T,U
Salmonella O Antiserum Poly E	V,W,X,Y,Z
Salmonella O Antiserum Poly F	51-55
Salmonella O Antiserum Poly G	56-61

*Las cepas de los grupos E₂ y E₃ son lisogenizadas por el bacteriófago 15, luego por el 34. Dichas cepas ahora se clasifican en el grupo E₁.²

Si se produce aglutinación, utilizar **Difco** Salmonella O Group Antisera individuales para determinar el serogrupo específico al que pertenece el aislado. Por motivos de eficacia, analizar primero con **Difco** Salmonella O Group Antisera B, D y C₁ individuales (los serogrupos más comunes).

Si no se produce aglutinación con *Salmonella* O Antiserum Poly A o *Salmonella* O Antiserum Poly B, analizar el aislado con **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si el resultado es positivo, calentar y repetir la prueba con **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si se produce aglutinación después de hervir con **Difco** Salmonella Antiserum Vi, es probable que el aislado no sea *Salmonella*. Si no se produce aglutinación con **Difco** Salmonella Antiserum Vi después de hervir, analizar el cultivo hervido con **Difco** Salmonella O Antisera individuales. Si los resultados de la prueba son indeterminados, los aislados deben enviarse a un laboratorio de referencia para realizar pruebas adicionales.

Si no se produce aglutinación con *Salmonella* O Antiserum Poly C, D, E, F y G, es probable que el aislado no sea *Salmonella*.

Tabla 1. – Esquema I para el uso de Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F y G.

Prueba con		Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F y G			
Resultado de la prueba	+	– con Poly A o B			– con Poly C, D, E, F y G
Prueba con	Salmonella O Antisera individuales	Salmonella O Antiserum Vi			
Resultado de la prueba	+ con un Salmonella O Antiserum (requerido)	+		–	
Prueba con		Calentar y repetir la prueba con Salmonella O Antiserum Vi			
Resultado de la prueba		+	–		
Conclusión de la prueba o acción siguiente	Determinar el Salmonella H Antigen	Aislado de prueba no es <i>Salmonella</i>	Analizar el cultivo hervido con Salmonella O Antisera individuales	Aislado de prueba no es <i>Salmonella</i>	Aislado de prueba no es <i>Salmonella</i>

Salmonella O Antiserum Poly A-I y Vi, esquema II (véase Tabla 2 a continuación): Este antisuero detecta los factores 1-16, 19, 22-25, 34 y Vi. Esta combinación de factores representa los grupos A-I aislados más frecuentes y los antígenos Vi, y se utiliza para la detección sistemática de posibles aislados de *Salmonella*. Una reacción posible indica que se necesitan más pruebas serológicas para identificar el aislado con **Difco** Salmonella O Group Antisera. Los serogrupos más comunes son B, D y C₁. Para motivos de eficacia, primero utilizar **Difco** Salmonella O Group Antisera para dichos serogrupos.

Si el aislado es positivo con **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I y Vi pero negativo con los antisueros somáticos específicos, analizar el aislado con **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si se obtiene un resultado positivo con **Difco** Salmonella Antiserum Vi, calentar y repetir la prueba con **Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si se obtiene un resultado positivo con **Difco** Salmonella O Antiserum Vi después de hervir, es posible que el aislado no sea *Salmonella*. Si no se produce aglutinación con **Difco** Salmonella Antiserum Vi después de hervir, analizar el cultivo hervido con **Difco** Salmonella O Antisera individuales. Si los resultados de la prueba son indeterminados, los aislados deben enviarse a un laboratorio de referencia para realizar pruebas adicionales.

Una reacción negativa con **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I y Vi indica que el aislado no pertenece a los serogrupos A-I. Si las reacciones bioquímicas son acordes con *Salmonella*, es posible que se trate de un serogrupo diferente de A-I. Se requieren más pruebas con antisueros para antígenos de otros serogrupos.

Tabla 2. – Esquema II para el uso de Salmonella O Antiserum Poly A-I y Vi.

Prueba con	Salmonella O Antiserum Poly A-I y Vi				
Resultado de la prueba	+			–	
Prueba con	Salmonella O Antisera individuales				
Resultado de la prueba	+	–			
Prueba con		Salmonella O Antiserum Vi			
Resultado de la prueba			+	–	
Prueba con		Calentar y repetir la prueba con Salmonella O Antiserum Vi			
Resultado de la prueba		+	–		
Conclusión de la prueba o acción siguiente	Determinar el Salmonella H Antigen	Aislado de prueba no es <i>Salmonella</i>	Analizar el cultivo hervido con Salmonella O Antisera individuales	Aislado de prueba no es <i>Salmonella</i>	<i>Puede ser Salmonella</i> detectable mediante el uso de Salmonella O Antisera Poly C, D, E, F o G

Antisueros de factor de grupo y de un solo factor para Salmonella O: Utilizar **Difco** Salmonella O Group Antisera seleccionados para identificación adicional de aislados. Son posibles las reacciones cruzadas entre los serogrupos con antígenos en común. Véase esta lista parcial de **Difco** Salmonella O Group Antisera como ejemplo:

Salmonella O Antiserum Group A Factors 1, 2, 12; Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 5, 12; Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 12, 27

Los factores 1 y 12 se producen en combinación con otros antígenos y pueden causar reacciones cruzadas. La potencia de las reacciones ayuda en la interpretación. Una aglutinación de 3+ o mayor, de formación rápida, indica una reacción homóloga.

Utilizar los **Difco** Salmonella O Factor Antisera seleccionados. Para lograr una identificación adicional del aislado, se utilizan antisueros absorbidos específicos para un antígeno identificable en un serogrupo determinado. En el ejemplo anterior, se podrían utilizar los **Difco** Salmonella O Factor Antisera:

Salmonella O Antiserum Factor 2; Salmonella O Antiserum Factor 4; Salmonella O Antiserum Factors 4, 5; Salmonella O Antiserum Factor 5

Antisueros polivalentes para Salmonella H: La identificación adicional de un aislado de *Salmonella* incluye la caracterización de los antígenos flagelares. Se puede realizar la determinación de serogrupo con los siguientes **Difco** Polyvalent H Antisera:

Antisueros de grupo polivalentes para Salmonella H	Antígenos flagelares presentes
Salmonella H Antiserum Poly a-z	Grupos EN,G,L,Z ₄ , 1 complejos y a-k,r-z,Z ₆ ,Z ₁₀ ,Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly A	Grupos a,b,c,d,i,Z ₁₀ ,Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly B	Grupos eh,en,enx,enZ ₁₅ , complejo G
Salmonella H Antiserum Poly C	Grupos k,l,r,y,Z ₄
Salmonella H Antiserum Poly D	Grupos Z ₃₅ ,Z ₃₆ ,Z ₃₇ ,Z ₃₈ ,Z ₃₉ ,Z ₄₁ ,Z ₄₂
Salmonella H Antiserum Poly E	1 complejo Z ₆

Los antisueros de antígeno H absorbidos específicos para determinados antígenos o complejo de antígenos pueden utilizarse para realizar una identificación adicional del aislado.

Antisueros de antígeno H absorbidos y no absorbidos: La identificación completa de un aislado de *Salmonella* conlleva el análisis de factores de fase 1 y 2 mediante el antisuero de antígeno H. Para el patrón de complejos de análisis y procedimientos, consultar las referencias correspondientes⁹.

Salmonella H Antisera Spicer-Edwards: **Difco** Salmonella H Antisera Spicer-Edwards se utiliza para la detección sistemática e identificación de las cepas de *Salmonella* más frecuentes, mediante una combinación de antisueros de complejos específicos y polivalentes.

Tabla 3. – Identificación de Salmonella H mediante Salmonella H Antisera Spicer-Edwards.

H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antisera Spicer-Edwards			
	1	2	3	4		1	2	3	4
a	+	+	+	–	k	–	+	+	+
b	+	+	–	+	r	–	+	–	+
c	+	+	–	–	y	–	+	–	–
d	+	–	+	+	z	–	–	+	+
e,h	+	–	+	–	Z ₄ Complex**	–	–	+	–
G Complex*	+	–	–	+	Z ₁₀	–	–	–	+
i	+	–	–	–	Z ₂₉	–	+	+	–

*El componente de complejo G de Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1 y 4 reacciona con los antígenos f,g; f,g,s; f,g,t; g,m; g,m,q; g,m,s; g,m,s,t; g,m,t; g,p; g,p,s; g,p,u; g,q; g,s,t; g,t; m,p,t,u y m,t.

**El componente de complejo Z₄ reacciona con Z₄,Z₂₃; Z₄,Z₂₄ Y Z₄,Z₃₂.

Observar que no hay antígenos con resultado positivo para los cuatro Salmonella H Antisera Spicer-Edwards. Los antígenos que reaccionen con los cuatro sueros deben verificarse para determinar su uniformidad.

Método de prueba del portaobjetos

Antisueros para Salmonella O y Vi

Utilizar este procedimiento para analizar el aislado con cada antisuero seleccionado.

- Colocar 1 gota (35 µL) de cada antisuero a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación.
- Desde un medio de agar sólido, transferir una parte de un asa entera de una colonia aislada al área de reacción anterior y mezclar bien.
- Control negativo:** Colocar 1 gota de solución de NaCl al 0,85% estéril en un portaobjetos de aglutinación. Colocar 1 gota de cada **Difco** Salmonella O Antiserum a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación y mezclar bien.
- Control positivo:** Colocar 1 gota de cada **Difco** Salmonella O Antiserum a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación. Añadir 1 gota de **Difco** QC Antigen Salmonella apropiado o de cultivos de referencia de identificación serológica conocida.
- Girar el portaobjetos durante 1 min y efectuar la lectura para determinar si se ha producido aglutinación. Los resultados se deben leer en el plazo de 1 min.

Preparación de la prueba en tubo

- Salina formalinizada al 0,6%:** Preparar añadiendo 6 mL de formaldehído cada 1.000 mL de solución de NaCl al 0,85% estéril.
- Organismo de prueba:** A menudo es necesario incrementar la movilidad del organismo de prueba. Con este fin, se deben realizar varias transferencias consecutivas del Motility GI Medium.
 - Inocular el tubo levemente por debajo de la superficie del medio con una aguja de inoculación.
 - Incubar a 35 – 37 °C durante 18–20 h.
 - Transferir sólo los organismos que han migrado al fondo del tubo.
 - Cuando el organismo se desplace satisfactoriamente 50-60 mm por el medio en un plazo de 18 – 20 h, estará listo para su utilización.
 - Se recomienda un caldo de infusión como el caldo de infusión de ternera para el cultivo de *Salmonella* móvil antes del análisis. Debe inocularse e incubarse a 35 °C durante 24 h. Se puede utilizar caldo de infusión de cerebro y corazón con incubación a una temperatura de 35 °C durante 4 – 6 h. Si se utiliza caldo de soja triptico, incubar a 35 °C durante 24 h.
 - Preparar la suspensión del organismo de prueba utilizando volúmenes iguales de cultivo de caldo y solución salina formalinizada al 0,6%. La densidad final de esta suspensión de prueba debe ser equivalente al patrón de turbidez N° 3 de McFarland.
- Control positivo:** No se encuentran disponibles antígenos de *Salmonella* H de control de calidad preparados comercialmente. El usuario debe mantener cultivos de referencia de identificación serológica conocida para su uso con fines de control de calidad. Preparar el antígeno utilizando serotipos conocidos y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. (Véase **Organismo de prueba**, anteriormente en el documento.)
- Antisueros para Salmonella H:** Los antisueros reconstituidos se consideran como diluciones de trabajo 1:2. Preparar las diluciones de la manera siguiente y utilizar en el día de preparación. Desechar cualquier porción no utilizada.
 - La mayoría de los **antisueros para Salmonella H:** Preparar una dilución de 1:250 añadiendo 0,1 mL de antisuero reconstituido a 25 mL de solución de NaCl al 0,85%. Después de mezclar cantidades iguales (0,5 mL) de antisuero diluido y aislado de prueba, la dilución final es de 1:1.000.
 - Salmonella H Antisera x, z₁₃, z₁₅ y z₂₈:** Preparar una dilución de 1:125 añadiendo 0,1 mL de antisuero reconstituido a 12,5 mL de solución de NaCl al 0,85%. Después de mezclar cantidades iguales (0,5 mL) de antisuero diluido y aislado de prueba, la dilución final es de 1:500.
 - Salmonella H Antiserum Poly a-z:** Preparar una dilución de 1:25 añadiendo 0,1 mL de antisuero reconstituido a 2,5 mL de solución de NaCl al 0,85%. Después de mezclar cantidades iguales (0,5 mL) de antisuero diluido y aislado de prueba, la dilución final es de 1:100.

Procedimiento de prueba en tubo

Antisueros para Salmonella H

- Preparar un tubo de ensayo de 12 x 75 mm para cada muestra a analizar.
- Antisuero diluido:** Dosificar 0,5 mL en cada tubo.
- Aislado de prueba:** Añadir 0,5 mL al tubo correspondiente.
- Control positivo:** Añadir 0,5 mL de control positivo de antígeno a un tubo con 0,5 mL de antisuero.
- Control negativo:** Añadir 0,5 mL de solución de NaCl al 0,85% a un tubo con 0,5 mL de aislado de prueba.
- Incubar todos los tubos en baño María a 50 ± 2 °C durante 1 h.
- Efectuar una lectura para determinar floculación (aglutinación).
- Repetir la prueba en tubo con un organismo de prueba con fase inversa. (Véase el procedimiento para **Inversión de fase** a continuación.)

Inversión de fase

- Preparar medio de inversión de fase para Motility GI Medium según las instrucciones.
- Preparar el antisuero contrario a la fase deseada. Por ejemplo, la incubación de *Salmonella* Typhimurium fase 1[i] en GI Motility Medium con antisuero i permite el crecimiento y la propagación de S. Typhimurium fase 2 [1,2].
- Añadir 1 mL de una dilución 1:10 de antisuero a 25 mL de GI Motility Medium estéril y mezclar bien. Verter en una placa de Petri estéril y dejar solidificar.
- Inocular perforando el borde del medio solidificado.
- Incubar a 35 – 37 °C durante 24 h.
- Transferir el crecimiento del borde de propagación frente al sitio de inoculación a un medio líquido para análisis según los pasos en la sección **Procedimiento de prueba en tubo: Antisueros para Salmonella H**.
- Si la movilidad no es aceptable, realizar otra pasada por el Motility GI Medium.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards

- Preparar el organismo de prueba y la dilución de antisuero 1:2 según se ha descrito anteriormente en Preparación de la prueba en tubo.
- Dilución de antisuero de 1:1.000 final:** Preparar añadiendo 0,1 mL de antisuero reconstituido (dilución de trabajo de 1:2) a 25 mL de solución de NaCl al 0,85%.
- Preparar 4 tubos de cultivo de 12 x 75 mm para cada organismo de prueba.
- Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1-4:** Añadir 0,5 mL de antisuero diluido en los tubos de ensayo.
- Organismo de prueba:** Agregar 0,5 mL a cada tubo.
- Incubar los tubos en baño María a 50 ± 2 °C durante 1 h.
- Quitar del baño María. Evitar agitar en exceso cuando los tubos se encuentren en el baño María o cuando se los extraiga del mismo antes de efectuar la lectura de las reacciones.
- Efectuar una lectura para determinar floculación (aglutinación).

Control de calidad del usuario: En el momento de uso, aplicar controles tanto homólogos como heterólogos para comprobar el rendimiento del antisuero, las técnicas y la metodología. **Difco** QC Antigenes Salmonella puede utilizarse como control homólogo. Para más instrucciones, consultar el folleto de **Difco** QC Antigenes Salmonella. El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de NCCLS y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

Prueba en portaobjetos

- Leer y registrar los resultados de la siguiente forma:

4+	100% de aglutinación (fondo de transparente a ligeramente lechoso).	1+	25% de aglutinación (fondo turbio).
3+	75% de aglutinación (fondo ligeramente turbio).	–	Sin aglutinación.
2+	50% de aglutinación (fondo moderadamente turbio).		

- El control positivo debe indicar una aglutinación de 3+ o mayor.
- El control negativo no debe mostrar ningún indicio de aglutinación.
- Para las cepas aisladas del análisis, un valor de aglutinación de 3+ o mayor indica un resultado positivo.
- Una aglutinación parcial (menos de 3+) o demorada debe considerarse como reacción negativa.
- Si se requiere una identificación de antígeno de *Salmonella* H, continuar en la sección siguiente.

Prueba en tubo

- Leer y registrar los resultados de la siguiente forma:

4+	100% de aglutinación (fondo de transparente a ligeramente lechoso).	1+	25% de aglutinación (fondo turbio).
3+	75% de aglutinación (fondo ligeramente turbio).	–	Sin aglutinación.
2+	50% de aglutinación (fondo moderadamente turbio).		

- El control positivo debe indicar una aglutinación de 3+ o mayor en la dilución de prueba de rutina.
- El control negativo no debe mostrar ningún indicio de aglutinación.

Al utilizar **Difco** Salmonella H Spicer-Edwards, comparar los resultados con los patrones de floculación (aglutinación) del esquema de Spicer-Edwards (véase la Tabla 3, arriba).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Para una identificación final, se requiere la caracterización completa de los antígenos O y H de un aislado de *Salmonella*. Debido a la complejidad de los procedimientos de laboratorio, la identificación con antisueros polivalentes puede ser suficiente para la mayoría de los laboratorios.
- Los aislados posiblemente de *Salmonella* que presenten discordancias en las reacciones bioquímicas y las pruebas de antígenos O y H deben remitirse a un laboratorio de referencia para análisis adicionales.
- El calor excesivo proveniente de fuentes externas (asa bacteriológica caliente, llama del mechero, fuente de luz, etc.) puede impedir la formación de una suspensión uniforme del microorganismo o causar la evaporación o precipitación de la mezcla de análisis. Pueden ocurrir reacciones positivas falsas.
- Efectivamente ocurren cepas aisladas de cultivos rugosos, las cuales se aglutinarán espontáneamente, lo que causa la aglutinación de la reacción de control negativo (autoaglutinación). Es necesario seleccionar y analizar colonias uniformes en los procedimientos serológicos.

5. En el procedimiento de aglutinación en portaobjetos para el análisis de antígeno O, se recomienda que se analicen varias colonias y que se utilicen antisueros polivalentes no absorbidos seguidos de antisueros de un factor absorbidos. Por ejemplo, las colonias de un cultivo 1,2,12 en una placa de agar presentarán diversos niveles de cada antígeno. Un antisuero 1,2,12 absorbido de anticuerpos 1 y 12 será altamente específico, pero mostrará aglutinación débil o nula con las colonias que tienen menos del antígeno 2 y más del antígeno 1 y 12. El uso de **Difco** Salmonella O Antiserum Group A no absorbido, factores 1,2,12, para analizar varias colonias presuntas en una placa, seguido del análisis con **Difco** Salmonella O Antiserum absorbido, factor 2, otorga el equilibrio necesario de sensibilidad y especificidad.
6. Las reacciones de aglutinación de 3+ o mayor se interpretan como reacciones positivas. Las reacciones cruzadas que generan aglutinación de 1+ o 2+ son posibles, dado que existen antígenos somáticos en común entre diferentes grupos como antígenos de grupos secundarios.
7. Pueden existir antígenos en común entre diversos serogrupos “O” de *Salmonella*. Por ejemplo, **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A contiene, entre otros, aglutininas para factor 1, dado que los cultivos con factor 1 se utilizaron en la inmunización. Se puede esperar que este antisuero polivalente reaccione con cultivos diferentes a los contenidos en los serogrupos “O” A, B, D, E y L debido al antígeno 1 en común (los organismos en el grupo G₁, G₂, H, R, T, etc., que contienen el factor 1).
8. **Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I y Vi se ha preparado con miembros representativos de aquellos grupos somáticos y no se ha absorbido. Es evidente que este suero puede reaccionar y reaccionará con grupos O de *Salmonella* más elevados.
9. La técnica de aglutinación en tubo se recomienda para el análisis de antígeno H porque pueden ocurrir reacciones cruzadas con antígenos somáticos en las diluciones utilizadas en la técnica en portaobjetos.
10. En la prueba en tubo, es necesario asegurarse de preparar la dilución adecuada para un antisuero determinado. Se utilizan diversas diluciones para antisueros distintos. Consulte los detalles en la sección **Preparación de la prueba en tubo**.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Salmonella O Antisera y Salmonella Antiserum Vi: La sensibilidad de **Difco** Salmonella O Antisera y Salmonella Antiserum Vi se determina al demostrar la reactividad correspondiente, como se define en la sección Resultados, Prueba en portaobjetos, frente a un conjunto de cultivos homólogos de *Salmonella* (véase la Tabla 4, a continuación). La especificidad se determina al demostrar la falta de reactividad frente a grupos no relacionados (heterólogos) de *Salmonella*.

Antisueros para Salmonella H

La sensibilidad de **Difco** Salmonella H Antisera se determina al demostrar la reactividad correspondiente, como se define en la sección Resultados, Prueba en portaobjetos, frente a un conjunto de cultivos homólogos de *Salmonella* (véase la Tabla 5, página 11). La especificidad se determina al demostrar la falta de reactividad frente a grupos no relacionados (heterólogos) de *Salmonella*.

DISPONIBILIDAD: véase página 12

REFERENCIAS: Ver “References” en el texto en inglés.

Table 4. / Tableau 4. / Tabelle 4 / Tabella 4. / Table 4.

	Product / Produit / Produkt / Prodotto / Producto	Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados	
		Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
229471	Salmonella O Antiserum Group A Factors 1, 2, 12	A	Paratyphi A 1,2,12
228141	Salmonella O Antiserum Factor 2		Paratyphi A 2,12 var. Durazzo
229481	Salmonella O Antiserum Group B Factors 1,4,5,12	B	Paratyphi B 1,4,(5),12
229731	Salmonella O Antiserum Group B Factors 1,4,12, 27		Essen 4,12
226591	Salmonella O Antiserum Factor 4		Paratyphi B 1,4,(5),12
226601	Salmonella O Antiserum Factor 5		Schleissheim 4,12,27
226671	Salmonella O Antiserum Factor 27		Typhimurium 1,4,(5),12 Schleissheim 4,12,27
229491	Salmonella O Antiserum Group C1 Factors 6,7	C	Kentucky 8,20 Thompson 6,7,14 Newport 6,8 Virginia 8
229501	Salmonella O Antiserum Group C2 Factors 6,8		
230161	Salmonella O Antiserum Group C3 Factors (8), 20		
226621	Salmonella O Antiserum Factor 20		
226611	Salmonella O Antiserum Factor 14		
228161	Salmonella O Antiserum Factor 7	D	Enteritidis 1,9,12 Typhi 9,12,(Vi) Pullorum 1,9,12 Haarlem (9),46
229511	Salmonella O Antiserum Group D1 Factors 1,9,12		
230171	Salmonella O Antiserum Group D2 Factors (9), 46		
228181	Salmonella O Antiserum Factor 9		
228191	Salmonella O Antiserum Group E Factors 1,3,10,15,19,34	E	Illinois 3,15,34 Anatum 3,10 London 3,10,26 Newington 3, 15 Sentftenberg 1,3,19
229521	Salmonella O Antiserum Group E1 Factors 3,10		
229541	Salmonella O Antiserum Group E2 Factors 3,15		
230181	Salmonella O Antiserum Group E3 Factors (3),(15),34		
230191	Salmonella O Antiserum Group E4 Factors 1,3,19		
222571	Salmonella O Antiserum Factor 10		
222581	Salmonella O Antiserum Factor 15		
222591	Salmonella O Antiserum Factor 19		
211778	Salmonella O Antiserum Factor 34		
222601	Salmonella O Antiserum Group F Factor 11	F	Rubislaw 11
230291	Salmonella O Antiserum Group G Factors 13,22,23, (36), (37)	G	Wichita 1,13,23
222611	Salmonella O Antiserum Group G1 Factors 13, 22, (36)		
230201	Salmonella O Antiserum Group G2 Factors 1,13,23,(37)		
226631	Salmonella O Antiserum Factor 22		
226641	Salmonella O Antiserum Factor 23		
222621	Salmonella O Antiserum Group H Factors 1,6,14,24,25	H	Florida (1),6,14,(25)
226661	Salmonella O Antiserum Factor 25		
222631	Salmonella O Antiserum Group I Factor 16	I	Gaminara 16
211780	Salmonella O Antiserum Group J Factor 17	J	Kirkee 17
225181	Salmonella O Antiserum Group K Factor 18	K	Cerro 6,14,18
225191	Salmonella O Antiserum Group L Factor 21	L	Minnesota 21,26
211781	Salmonella O Antiserum Group M Factor 28	M	Telaviv 28ab Dakar 28ac
211783	Salmonella O Antiserum Group N Factor 30	N	Urbana 30ab
225221	Salmonella O Antiserum Group O Factor 35	O	Adelaide 35

 **225341 Salmonella O Antiserum Poly A (Groups A,B,D,E1,E2,E3,E4 and L) Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
A	Paratyphi A 1,2,12; Paratyphi A var; Durazzo 2,12	D	Enteritidis 1,9,12; Typhi 9,12,Vi; Pullorum 9,12; Haarlem (9),46
B	Paratyphi B 1,4,(5),12; Essen 4,12; Schleissheim 4,12,27	E	Anatum 3,10; London 3,10,26; Newington 3,15; Illinois (3),(15),34; Senftenberg 1,3,19
		L	Minnesota 21,26

 **225351 Salmonella O Antiserum Poly B (Groups C1,C2,F,G and H) Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
C1	Thompson 6,9,(14)	G1	Poona (1),13,22,(36)
C2	Newport 6,8	G2	Worthington 1,13,23,(37); Grumpensis 13,23
F	Rubislaw 11	H	Carrau 6,14,24; Florida 1,6,14,25; Boecker (1),6,14,(25)

 **225361 Salmonella O Antiserum Poly C (Groups I,J,K,M,N and O) Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
I	Gaminara 16	M	Telaviv 28ab; Dakar 28ac; Aderike 28
J	Kirkee 17	N	Urbana 30
K	Cerro 6,14,18	O	Adelaide 35

 **225371 Salmonella O Antiserum Poly D (Groups P,Q,R,S,T and U) Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
P	Inverness 38	S	Waycross (1),41
Q	Champaign 39	T	Weslaco (1),42; Loenga 1,42ab
R	Riogrande (1),40ab; Bulawayo 1,40ac,49	U	Milwaukee 43abc, Bunnik 43acd

 **225381 Salmonella O Antiserum Poly E (Groups V,W,X,Y and Z) Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
V	Niarembe (1),44	Y	Dahlem 48ab; Djakarta 48abc
W	Devesoir 45ab; Dugbe 45ac	Z	Wassenaar 40abc; Greenside 50abd
X	Bergen (1),47ab; Kaolack (1),47ac		

 **226451 Salmonella O Antiserum Poly F (Groups 51-55) Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
51	Treforest 1,51; Haarlem 51	54	Uccle 54
52	Utrecht 52	55	Tranoroa 55
53	Humber 1,53		

 **226461 Salmonella O Antiserum Poly G (Groups 56-61) Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
56	Artis 56	59	Betoiky 59
57	Locarno 57	60	Luton 60
58	Basel 58	61	Eilbek 61

 **228271 Salmonella Antiserum Vi Homologous Cultures Tested** / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
Vi	Typhi (felix) 9, 12, Vi Ballerup Vi

Table 5. / Tableau 5. / Tabelle 5 / Tabella 5. / Tabla 5.

	Product / Produit / Produkt / Prodotto / Producto	Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo		
222691	Salmonella H Antiserum G Complex	G Complex	Derby f,g; Berta f,g,t; Enteritidis g,m; Bledgam g,m,q; Montevideo g,m,(p),s; Dublin g,p; Rostock g,p,u; Senftenberg g,(s),t; Budapest g,t; Oranienburg m,t		
225441	Salmonella H Antiserum f				
225461	Salmonella H Antiserum m				
225481	Salmonella H Antiserum p				
225501	Salmonella H Antiserum s				
225511	Salmonella H Antiserum t	L Complex	Bredeney l,v; London l,v; Worthington l,w; Livingstone l,w; Morocco l,z ₁₃ ,z ₂₈ ; Javiana l,z ₂₈ ; Rutgers l,z ₄₀ ; Lz ₁₉ , l,z ₁₃ , l,z ₁₃		
222711	Salmonella H Antiserum L Complex				
225541	Salmonella H Antiserum w				
225561	Salmonella H Antiserum z ₁₃				
225611	Salmonella H Antiserum z ₂₈				
222721	Salmonella H Antiserum 1 Complex	1 Complex	Newport var. puertorico 1,2; Thompson var. berlin 1,5 3,10;1,6 1,6; Madelia 1,7		
224741	Salmonella H Antiserum Single Factor 2				
224751	Salmonella H Antiserum Single Factor 5				
224761	Salmonella H Antiserum Single Factor 6				
224771	Salmonella H Antiserum Single Factor 7				
222701	Salmonella H Antiserum EN Complex	EN Complex	Abortusequi e,n,x; Salinatis (PC 230) e,n,z ₁₅		
225551	Salmonella H Antiserum x				
225571	Salmonella H Antiserum z ₁₅				
222781	Salmonella H Antiserum Z ₄ Complex	Z ₄ Complex	Cerro z ₄ ,z ₂₃ ; Duesseldorf z ₄ ,z ₂₄ ; Tallahassee z ₄ ,z ₃₂		
225621	Salmonella H Antiserum z ₃₂				
225581	Salmonella H Antiserum z ₂₃				
225451	Salmonella H Antiserum h	h	Reading e,h		
222731	Salmonella H Antiserum eh				
222651	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 1		Spicer-Edwards	Paratyphi A a	Budapest g,t
222661	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 2	Paratyphi B b		Typhimurium l	
222671	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 3	Choleraesuis c		Oranienburg m,t	
222681	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 4	Paratyphi C c		Madelia y	
228201	Salmonella H Antiserum a			S. typhi 901 d	
				Reading e,h	
				Derby f,g	Atlanta-Worthington z
				Berta f,g,t	
				Enteritidis g,m	Taksony z ₆
222741	Salmonella H Antiserum k			Bledgam g,m,q	Cerro z ₄ ,z ₂₃
				Montevideo g,m,(p),s	Duesseldorf z ₄ ,z ₂₄
				Dublin g,p	Tallahassee z ₄ ,z ₃₂
				Rostock g,p,u	Tennessee z ₂₉
					Illinois z ₁₀
222791	Salmonella H Antiserum z ₁₀	Seftenberg g,s,t			
222801	Salmonella H Antiserum z ₂₉				
224731	Salmonella H Antiserum z ₆				

 225391 Salmonella H Antiserum Poly A (Groups a, b, c, d, i, z₁₀ and z₂₉) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
a	Paratyphi A; Dakar; 58:a: (z ₆)	i	Typhimurium
b	Paratyphi B; Schleissheim; Artis	z ₁₀	Illinois (spec)
c	Choleraesuis; Paratyphi C; Deversoir	z ₂₉	Tennessee
d	Typhi 901		

 225401 Salmonella H Antiserum Poly B (Groups eh, en, enx, enz₁₅ and G complex) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
e,h	Reading	g,m,(p),s	Montevideo
e,n,x	Abortusequi	g,p	Dublin
e,n,z ₁₅	Salinatis (PC 230)	g,p,u	Rostock
f,g	Derby	g,(s),t	Senftenberg
f,g,t	Berta	g,t	Budapest
g,m	Enteritidis	m,t	Oranienburg
g,m,q	Blegdam		

 225411 Salmonella H Antiserum Poly C (Groups k, l, r, y, z and z₄) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
k	Thompson	r	Rubislaw
l,v	Bredeney	r,(l)	
l,w	Worthington (spec)	y	Madelia
l,z ₁₃	l,z ₁₉ ,l,z ₁₃	z	Atlanta-Worthington
l,z ₂₈	Javiana	z ₄ ,z ₂₃	Cerro
l,z ₁₃ ,z ₂₈		z ₄ ,z ₂₄	Duesseldorf
l,z ₄₀	Rutgers	z ₄ ,z ₃₂	Tallahassee

 225421 Salmonella H Antiserum Poly D (Groups z₃₅, z₃₆, z₃₇, z₃₈, z₃₉, z₄₁ and z₄₂) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
z ₃₅	Chittagong	z ₃₉	Quimbamba
z ₃₇	Wichita	z ₄₁	Karamoma
z ₃₈	Lille	z ₄₂	Locarno

 225431 Salmonella H Antiserum Poly E (Groups 1 Complex, z₆) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Colture omologhe testate / Cultivos homólogos analizados

Antigen Group / Groupe d'antigène / Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo	Antigen Group / Groupe d'antigène Antigengruppe / Gruppo di antigeni / Grupo de antígeno	Serovar / Sérotype / Serotipo
z ₆	Taksony	1,6	3,10;1,6
1,2	Newport var. puertorico	1,7	Madelia
1,5	Thompson var. berlin		

AVAILABILITY / CONDITIONNEMENT / LIEFERBARE PRODUKTE / DISPONIBILITÀ /DISPONIBILIDAD

Cat. No. N° réf. Best.- Nr. N. di cat. N° cat.	Description Description Beschreibung Descrizione Descripción	Cat. No. N° réf. Best.- Nr. N. di cat. N° cat.	Description Description Beschreibung Descrizione Descripción	Cat. No. N° réf. Best.- Nr. N. di cat. N° cat.	Description Description Beschreibung Descrizione Descripción
228201	Salmonella H Antiserum a, 1 x 3 mL	222661	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 2, 1 x 3 mL	230171	Salmonella O Antiserum Group D2 Factors (9), 46, 1 x 3 mL
228211	Salmonella H Antiserum b, 1 x 3 mL	222671	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 3, 1 x 3 mL	228191	Salmonella O Antiserum Group E Factors 1, 3, 10, 15, 19, 34, 1 x 3 mL
228221	Salmonella H Antiserum c, 1 x 3 mL	222681	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 4, 1 x 3 mL	229521	Salmonella O Antiserum Group E1 Factors 3, 10, 1 x 3 mL
228231	Salmonella H Antiserum d, 1 x 3 mL	222721	Salmonella H Antiserum 1 Complex, 1 x 3 mL	229541	Salmonella O Antiserum Group E2 Factors 3, 15, 1 x 3 mL
222731	Salmonella H Antiserum eh, 1 x 3 mL	228141	Salmonella O Antiserum Factor 2, 1 x 3 mL	230181	Salmonella O Antiserum Group E3 Factors (3), (15), 34, 1 x 3 mL
225441	Salmonella H Antiserum f, 1 x 3 mL	226591	Salmonella O Antiserum Factor 4, 1 x 3 mL	230191	Salmonella O Antiserum Group E4 Factors 1, 3, 19, 1 x 3 mL
225451	Salmonella H Antiserum h, 1 x 3 mL	228151	Salmonella O Antiserum Factors 4,5, 1 x 3 mL	222601	Salmonella O Antiserum Group F Factor 11, 1 x 3 mL
228241	Salmonella H Antiserum i, 1 x 3 mL	226601	Salmonella O Antiserum Factor 5, 1 x 3 mL	230291	Salmonella O Antiserum Group G Factors 13, 22, 23, (36), (37), 1 x 3 mL
222741	Salmonella H Antiserum k, 1 x 3 mL	228161	Salmonella O Antiserum Factor 7, 1 x 3 mL	222611	Salmonella O Antiserum Group G1 Factors 13, 22, (36), 1 x 3 mL
225461	Salmonella H Antiserum m, 1 x 3 mL	228171	Salmonella O Antiserum Factor 8, 1 x 3 mL	230201	Salmonella O Antiserum Group G2 Factors 1, 13, 23, (37), 1 x 3 mL
225481	Salmonella H Antiserum p, 1 x 3 mL	228181	Salmonella O Antiserum Factor 9, 1 x 3 mL	222621	Salmonella O Antiserum Group H Factors 1, 6, 14, 24, 25, 1 x 3 mL
222751	Salmonella H Antiserum r, 1 x 3 mL	222571	Salmonella O Antiserum Factor 10, 1 x 3 mL	222631	Salmonella O Antiserum Group I Factor 16, 1 x 3 mL
225501	Salmonella H Antiserum s, 1 x 3 mL	227791	Salmonella O Antiserum Factor 12, 1 x 3 mL	211780	Salmonella O Antiserum Group J Factor 17, 1 x 3 mL
225511	Salmonella H Antiserum t, 1 x 3 mL	226611	Salmonella O Antiserum Factor 14, 1 x 3 mL	225181	Salmonella O Antiserum Group K Factor 18, 1 x 3 mL
225541	Salmonella H Antiserum w, 1 x 3 mL	222581	Salmonella O Antiserum Factor 15, 1 x 3 mL	225191	Salmonella O Antiserum Group L Factor 21, 1 x 3 mL
225551	Salmonella H Antiserum x, 1 x 3 mL	222591	Salmonella O Antiserum Factor 19, 1 x 3 mL	211781	Salmonella O Antiserum Group M Factor 28, 1 x 3 mL
222761	Salmonella H Antiserum y, 1 x 3 mL	226621	Salmonella O Antiserum Factor 20, 1 x 3 mL	211783	Salmonella O Antiserum Group N Factor 30, 1 x 3 mL
222771	Salmonella H Antiserum z, 1 x 3 mL	226631	Salmonella O Antiserum Factor 22, 1 x 3 mL	225221	Salmonella O Antiserum Group O Factor 35, 1 x 3 mL
224731	Salmonella H Antiserum z ₆ , 1 x 3 mL	226641	Salmonella O Antiserum Factor 23, 1 x 3 mL	222641	Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi, 1 x 3 mL
222791	Salmonella H Antiserum z ₁₀ , 1 x 3 mL	226661	Salmonella O Antiserum Factor 25, 1 x 3 mL	225341	Salmonella O Antiserum Poly A (A, B, D, E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ , & L), 1 x 3 mL
225561	Salmonella H Antiserum z ₁₃ , 1 x 3 mL	226671	Salmonella O Antiserum Factor 27, 1 x 3 mL	225351	Salmonella O Antiserum Poly B (C ₁ , C ₂ , F, G, & H), 1 x 3 mL
225571	Salmonella H Antiserum z ₁₅ , 1 x 3 mL	211778	Salmonella O Antiserum Factor 34, 1 x 3 mL	225361	Salmonella O Antiserum Poly C (I, J, K, M, N, & O), 1 x 3 mL
225581	Salmonella H Antiserum z ₂₃ , 1 x 3 mL	229471	Salmonella O Antiserum Group A Factors 1, 2, 12, 1 x 3 mL	225371	Salmonella O Antiserum Poly D (P, Q, R, S, T, & U), 1 x 3 mL
225611	Salmonella H Antiserum z ₂₈ , 1 x 3 mL	229481	Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 5, 12, 1 x 3 mL	225381	Salmonella O Antiserum Poly E (V, W, X, Y, & Z), 1 x 3 mL
222801	Salmonella H Antiserum z ₂₉ , 1 x 3 mL	229731	Salmonella O Antiserum Group B Factors 1, 4, 12, 27, 1 x 3 mL	226451	Salmonella O Antiserum Poly F (Groups 51-55), 1 x 3 mL
225621	Salmonella H Antiserum z ₃₂ , 1 x 3 mL	229491	Salmonella O Antiserum Group C1 Factors 6, 7, 1 x 3 mL	226461	Salmonella O Antiserum Poly G (Groups 56-61), 1 x 3 mL
222701	Salmonella H Antiserum EN Complex, 1 x 3 mL	229501	Salmonella O Antiserum Group C2 Factors 6, 8, 1 x 3 mL	228271	Salmonella Antiserum Vi, 1 x 3 mL
222691	Salmonella H Antiserum G Complex, 1 x 3 mL	230161	Salmonella O Antiserum Group C3 Factors (8), 20, 1 x 3 mL	241107	Salmonella O Grouping Antiserum Set, 1 set
222711	Salmonella H Antiserum L Complex, 1 x 3 mL	229511	Salmonella O Antiserum Group D1 Factors 1, 9, 12, 1 x 3 mL		Set contains: Thirteen vials, 3 mL each, of Poly Groups A, B(2), C ₁ , C ₂ , D ₁ , E, F, G,H, I, Vi, A-I & Vi
222781	Salmonella H Antiserum Z ₄ Complex, 1 x 3 mL				
224061	Salmonella H Antiserum Poly a-z, 1 x 3 mL				
225391	Salmonella H Antiserum Poly A (a,b,c,d,i,z ₁₀ ,z ₂₉), 1 x 3 mL				
225401	Salmonella H Antiserum Poly B (eh,en,ex,en _{z15} , and G Complex), 1 x 3 mL				
225411	Salmonella H Antiserum Poly C (k,l,r,y,z,z ₄), 1 x 3 mL				
225421	Salmonella H Antiserum Poly D (z ₃₅ ,z ₃₆ ,z ₃₇ ,z ₃₈ ,z ₃₉ ,z ₄₁ ,z ₄₂), 1 x 3 mL				
225431	Salmonella H Antiserum Poly E (1 Complex, z ₆), 1 x 3 mL				
224741	Salmonella H Antiserum Single Factor 2, 1 x 3 mL				
224751	Salmonella H Antiserum Single Factor 5, 1 x 3 mL				
224761	Salmonella H Antiserum Single Factor 6, 1 x 3 mL				
224771	Salmonella H Antiserum Single Factor 7, 1 x 3 mL				
222651	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 1, 1 x 3 mL				



Manufacturer / Producent / Fabrikant / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Ditta produttrice / Fabrikant / Fabricante / Tillverkare



Use by / Anvendes før / Houdbaar tot / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Usare entro / Brukes før / Utilizar em / Usar antes de / Använd före / YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) / JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) / VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) / ÁÁÁÁ-MM-JJ / ÁÁÁÁ-MM (MM = fin du mois) / JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) / EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) / ÁÁÁÁ-MM-GG / ÁÁÁÁ-MM (MM = fine mese) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = fim do mês) / áaaa-mm-dd / áaaa-mm (mm = fin del mes) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden)



Catalog number / Katalognummer / Catalogusnummer / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Numero di catalogo / Katalognummer / Número do catálogo / Número de catálogo / Katalognummer



Authorized Representative in the European Community / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Autoriseret representant i EU / Representante autorizado na União Europeia / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik



Temperature limitation / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Όριο θερμοκρασίας / Temperatura limite / Temperaturbegrensning / Limitação da temperatura / Limitación de temperatura / Temperaturbegränsning



Batch Code (Lot) / Batch kode (Lot) / Chargenummer (lot) / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Codice del lotto (partita) / Batch-kode (Serie) / Código do lote (Lote) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti)



Contains sufficient for <n> tests / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / Contenuto sufficiente per <n> test / Innholder tilstrekkelig for <n> tester / Contémo suficiente para <n> testes / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertil <n> antal tester



Consult Instructions for Use / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultare le istruzioni per l'uso / Se i brugsanvisningen / Consulte as instruções de utilização / Consultar las instrucciones de uso / Se brugsanvisningen



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663



BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20 • Fax: 353-61-47-25-46