

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

English: pages 1 – 3 Italiano: pagine 8 – 10
 Français : pages 3 – 5 Español: páginas 10 – 12
 Deutsch: Seiten 5 – 8



8085889(03)
 2016-03

R_x Only

Contact your local BD representative for instructions. / Съвръжете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokyнуy Vp poskytny mstn zstupce spolenosti BD. / Kontakt den lokale BD reprsentant for at f instruktner. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteys lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A hasznlat utasitst krje a BD helyi krviselttl. / Нусқаулар үшін жергілікті BD өкілімен хабарласыңыз. / Lai saņemtu norādījumus, sazinieties ar vietējo BD prstvi. / Naudojimo instrukcij teiraukits vietos BD įgaliojoto atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyska instrukcje uytokowania, skontaktuj si z lokalnym przedstawicielem BD. / Contacte o reprezentante local da BD para instrues. / Pentru instruciuni, contactai reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Instrukcie ziskate u miestneho zstupcu spolonosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta nrmaste BD-representant fr anvisningar. / Talimatlar iin yerel BD temsilcinizle temasa gein. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD.

INTENDED USE

BD Difco™ Salmonella O Antisera are used in slide agglutination tests for the identification of *Salmonella* by somatic (O) antigens.

BD Difco Salmonella H Antisera are used in tube agglutination tests for the identification of *Salmonella* by flagellar (H) antigens.

BD Difco Salmonella Vi Antiserum is used in slide agglutination tests for the identification of *Salmonella* Vi.

SUMMARY AND EXPLANATION

Salmonella species cause a variety of human diseases called salmonellosis. The range of disease is from mild self-limiting gastroenteritis to more severe forms, possibly with bacteremia or typhoid fever, which can be life threatening. Severe disease and bacteremia are associated primarily with three serovars of *S. enterica* subsp. *enterica* (Choleraesuis, Paratyphi A and Typhi), while most of the other 2,300 or more strains are associated with gastroenteritis. The severity of the diarrheal disease depends upon the virulence of the strain and the condition of the human host.

Salmonella is found in nature and occurs in the intestinal tract of many animals, both wild and domestic. The microorganism can spread to man from contact with the environment or from eating meat or vegetable food products.

All *Salmonella* serovars belong to two species: *S. bongori*, which contains 18 serovars, and *S. enterica*, which contains the remaining 2,300 or more serovars divided among six subspecies.^{1,2}

The six subspecies of *S. enterica* are:

- S. enterica* subsp. *enterica* (I or 1)
- S. enterica* subsp. *salamae* (II or 2)
- S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa or 3a)
- S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb or 3b)
- S. enterica* subsp. *houtenae* (IV or 4)
- S. enterica* subsp. *indica* (VI or 6)

Nomenclature and classification of these bacteria are constantly changing.³ *Salmonella* and the former *Arizona* should be considered a single genus, *Salmonella*.⁴ It is recommended that laboratories report the names of *Salmonella* serovars for the subspecies *enterica*. The serovar names are no longer italicized and the first letter is capitalized. For example, the strain that used to be identified as *Salmonella typhimurium* is now known as *Salmonella* Typhimurium.

Serovars of other subspecies of *S. enterica* (except some in the subspecies *salamae* and *houtenae*) and those of *S. bongori* are not named and are designated by their antigenic formula. For the most recent information on nomenclature, consult appropriate references.¹⁻¹⁰

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Salmonella O antigens are somatic (O) heat-stable antigens and are identified first. The Vi antigen is a heat-labile envelope antigen that may surround a cell wall and mask somatic antigen activity. Microorganisms having the Vi Antigen will not agglutinate in O antisera. In order to determine the O antigen of these cultures, a suspension of the organism must be boiled to destroy the heat-labile envelope antigen and then tested with O antisera. The flagellar (H) antigens are heat labile and are usually associated with motility.

Complete serological characterization of *Salmonella* is not required for successful detection of the microorganism when it occurs as a pathogen. The use of adequate isolation procedures and differential biochemical tests is of primary importance. Because antigenic relationships exist between genera of the family *Enterobacteriaceae*, it is recommended that the isolate be biochemically identified as *Salmonella* prior to Serology testing. Possible *Salmonella* isolates can be presumptively identified with a minimum of serological identification. Isolates can be sent to laboratories that perform the level of testing necessary to completely identify the microorganism.

For a further discussion of the serological identification of *Salmonella*, consult appropriate references.^{1-3,9,11-14}

Identification of *Salmonella* species includes both biochemical and serological identification. Serological confirmation involves the procedure in which the microorganism (antigen) reacts with its corresponding antibody. This *in vitro* reaction produces macroscopic clumping called agglutination. The desired homologous reaction is rapid, does not dissociate (high avidity) and bonds strongly (high affinity).

Because a microorganism (antigen) may agglutinate with an antibody produced in response to another species, heterologous reactions are possible. Such unexpected and perhaps unpredictable reactions may lead to some confusion in serological identification. Therefore, a positive homologous agglutination reaction should support the morphological and biochemical identification of the microorganism.

Agglutination of the somatic antigen in the slide test appears as a firm granular clumping. Homologous reactions are rapid and strong (3+). Heterologous reactions are slow and weak.

Agglutination of flagellar antigens in the tube test appears as a loose flocculation that can easily be resuspended.

REAGENTS

BD Difco Salmonella O, H and Vi Antisera are lyophilized, polyclonal rabbit antisera containing approximately 0.2% sodium azide as a preservative.

BD Difco Salmonella O Poly Antisera are polyvalent antisera. Each antiserum is specific for certain serogroup antigens. When properly rehydrated and used as recommended, each vial of BD Difco Salmonella O or Vi Antisera contains sufficient reagent for 60 tests. BD Difco Salmonella O Poly A-I and Vi Antisera are prepared with representative strains of these serogroups and are not absorbed. They may cross-react because of shared common O antigens.

BD Difco Salmonella O Group Antisera are specific for the major factors present in the serogroup. BD Difco Salmonella O Factor Antisera are specific for the factors of the individual serogroups. When using BD Difco Salmonella O Group Antisera, cross-reactions are possible because serogroups may share non-major group antigens. BD Difco Salmonella O Factor Antisera are absorbed as necessary to render each antiserum as specific as practical without reducing the homologous reactions to an unsatisfactory level.

BD Difco Salmonella H Poly Antisera are polyvalent antisera specific for certain flagellar antigens. Each vial of BD Difco Salmonella H Antisera contains sufficient reagent to perform between 150-1500 tests, depending on the antiserum used. BD Difco Salmonella H Antisera are either absorbed or unabsorbed specifically for either phase 1 or phase 2 antigens. BD Difco Salmonella H Antisera Spicer-Edwards are pooled, polyvalent antisera and additional adjunctive antisera to identify the more commonly occurring H antigens.

Warnings and Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use.

This product contains dry natural rubber.

Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures. After use, specimens, containers, slides, tubes and other contaminated material must be sterilized by autoclaving. Directions for use should be followed carefully.

WARNING: This product contains sodium azide. Sodium azide is toxic by inhalation, by skin contact, and if swallowed. Contact with acid liberates very toxic gas. After contact with skin, wash immediately with plenty of water. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.

Warning



H302 Harmful if swallowed. **P264** Wash thoroughly after handling. **H301+P312** IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Storage: Store lyophilized and rehydrated BD Difco Salmonella O, H and Vi Antisera at 2-8 °C.

Expiration date applies to the product in its intact container when stored as directed.

Prolonged exposure of reagents to temperatures other than those specified is detrimental to the products.

Discard any antiserum that is cloudy or has a precipitate after rehydration or storage unless it can be clarified by centrifugation or filtration and demonstrates proper reactivity with validated positive and negative controls. Gross turbidity indicates contamination and such antisera should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Clinical specimens: *Salmonella* can be recovered from selective differential media such as Hektoen Enteric Agar or XLD agar. For specific recommendations, consult appropriate references.^{11,12} Determine that a pure culture of the microorganism has been obtained and that biochemical test reactions are consistent with the identification of the organism as a *Salmonella* species. After these criteria are met, serological identification can be performed.

Food samples: *Salmonella* can be recovered when samples are processed to recover injured microorganisms and prevent overgrowth of competing microorganisms. Consult appropriate references for recommended procedures for isolation of *Salmonella* from foods.^{13,14} Determine that a pure culture of the microorganism has been obtained and that biochemical test reactions are consistent with the identification of the organism as a *Salmonella* species. After these criteria have been met, serological identification can be performed.

The isolate for serological testing should be subcultured from selective media to a nonselective agar.

PROCEDURE

Materials Provided: BD Difco Salmonella O Antisera; BD Difco Salmonella H Antisera; or BD Difco Salmonella Antiserum Vi.

Materials Required But Not Provided: Slide Test: 0.85% NaCl solution, sterile; agglutination slides with 1 inch squares; applicator sticks; boiling water bath; centrifuge.

Tube Test: 0.85% NaCl solution, sterile; culture tubes, 12 x 75 mm, and rack; water bath, 50 ± 2 °C; serological pipettes, 1 mL; formaldehyde.

Reagent Preparation: Equilibrate all materials to room temperature prior to performing the tests. Ensure that all glassware and pipettes are clean and free of residues such as detergents.

To reconstitute, add 3 mL of sterile 0.85% NaCl solution and rotate gently to completely dissolve the contents. Reconstituted antisera are considered a 1:2 dilution.

Test Isolate for Autoagglutination

1. From the test culture on nonselective media, transfer a loopful of growth to a drop of sterile 0.85% saline on a clean slide and emulsify the organism.
2. Rotate the slide for 1 min, then observe for agglutination.
3. If agglutination (autoagglutination) occurs, the culture is rough and cannot be tested. Subculture to nonselective agar, incubate and test the organism again as described in steps 1 and 2.
4. If no agglutination occurs, proceed with testing the organism.

Choice of Antisera

Salmonella O Antisera: This serological identification Scheme I (See Table 1 below) begins with BD Difco Salmonella O Antisera Poly A through Poly G, which contain the following:

Salmonella Group Antisera	Somatic Groups Present
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

*Strains of groups E₂ and E₃ are lysogenized by phage 15, then by phage 34. These strains are now classified into group E₁.²

If agglutination occurs, use individual BD Difco Salmonella O Group Antisera to determine the specific serogroup to which the isolate belongs. For efficiency, test first with individual BD Difco Salmonella O Group Antisera B, D and C₁ (the most common serogroups).

If agglutination does not occur with Poly A or B, test the isolate with BD Difco Salmonella Antiserum Vi. If positive, heat and retest with BD Difco Salmonella Antiserum Vi. If agglutination occurs after boiling with BD Difco Salmonella Antiserum Vi, the isolate is not likely to be *Salmonella*. If agglutination does not occur with BD Difco Salmonella Antiserum Vi after boiling, test boiled culture with individual BD Difco Salmonella O Antisera. If test results are indeterminate, isolate should be sent to a reference laboratory for additional testing.

If agglutination does not occur with Poly C, D, E, F and G, the isolate is not likely to be *Salmonella*.

Table 1. – Scheme I for using Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F and G.

Test with	Salmonella O Antisera Poly Groups A, B, C, D, E, F and G				
Test Result	+	– with Poly A or B		– with Poly C, D, E, F and G	
Test with	Individual Salmonella O Antisera	Salmonella O Antiserum Vi			
Test Result	+ with one Salmonella O Antiserum (required)	+	–		
Test with		Heat and retest with Salmonella O Antiserum Vi			
Test Result		+	–		
Test Conclusion or Next Action	Determine the Salmonella H Antigen	Test isolate is not a <i>Salmonella</i>	Test boiled culture with individual Salmonella O Antisera	Test isolate is not a <i>Salmonella</i>	Test isolate is not a <i>Salmonella</i>

Salmonella O Antiserum Poly A-I and Vi Scheme II (See Table 2 below): This antiserum detects factors 1-16, 19, 22-25, 34 and Vi. This combination of factors represents the most frequently isolated Groups A-I and the Vi antigens and is used to screen possible *Salmonella* isolates.

A positive reaction indicates that further serological testing is needed to identify the isolate using **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum. The most common serogroups are B, D and C₁. For efficiency, first use the **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum for these serogroups.

If the isolate is positive with **BD Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi but negative with the specific somatic antiserum, test the isolate with **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. If positive with **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi, heat and retest with **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. If positive with **BD Difco** Salmonella O Antiserum Vi after boiling, the isolate is not likely to be *Salmonella*. If agglutination does not occur with **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi after boiling, test boiled culture with individual **BD Difco** Salmonella O Antiserum. If test results are indeterminate, isolate should be sent to a reference laboratory for additional testing.

A negative reaction with **BD Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi indicates the isolate is not in serogroups A-I. If the biochemical reactions are consistent with *Salmonella*, a serogroup other than A-I is possible. Further testing with antisera for other serogroup antigens is necessary.

Table 2. – Scheme II for using Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi.

Test with	Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi				
Test Result	+				–
Test with	Individual Salmonella O Antiserum				
Test Result	+	–			
Test with		Salmonella O Antiserum Vi			
Test Result		+	–		
Test with		Heat and retest with Salmonella O Antiserum Vi			
Test Result		+	–		
Test Conclusion or Next Action	Determine the Salmonella H Antigen	Test isolate is not a <i>Salmonella</i>	Test boiled culture with individual Salmonella O Antiserum	Test isolate is not a <i>Salmonella</i>	May be a <i>Salmonella</i> detectable by use of Salmonella O Antiserum Poly C, D, E, F or G

Salmonella O Group Factor and Single Factor Antiserum: Use selected **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum for further identification of isolates. Cross-reactions may occur between serogroups that share O antigens. Consider this partial list of **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum as an example:

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

Factors 1 and 12 occur in combination with other antigens and may cause cross-reactions. The strength of the reactions will help in interpretation. Rapidly forming 3+ or greater agglutination indicates a homologous reaction. Use selected **BD Difco** Salmonella O Factor Antiserum. Absorbed antiserum specific for an identifiable antigen in a given serogroup is used to identify the isolate further. In the example above, **BD Difco** Salmonella O Factor Antiserum could be used:

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

Polyvalent Salmonella H Antiserum: Further identification of a *Salmonella* isolate includes characterization of the flagellar antigens. Serogrouping with the following **BD Difco** Polyvalent H Antiserum can be done:

Salmonella H Poly Group Antiserum	Flagellar Antigens Present
Salmonella H Antiserum Poly a-z	Groups EN,G,L,Z ₄ , 1 complexes and a-k,r-z,Z ₆ ,Z ₁₀ ,Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly A	Groups a,b,c,d,i,Z ₁₀ ,Z ₂₉
Salmonella H Antiserum Poly B	Groups eh,en,ex,enz ₁₅ , G complex
Salmonella H Antiserum Poly C	Groups k,l,r,y,z,Z ₄
Salmonella H Antiserum Poly D	Groups Z ₃₅ ,Z ₃₆ ,Z ₃₇ ,Z ₃₈ ,Z ₃₉ ,Z ₄₁ ,Z ₄₂
Salmonella H Antiserum Poly E	1 complex, Z ₆

Absorbed H antiserum specific for single antigens or a complex of antigens can be used to identify the isolate further.

Unabsorbed and Absorbed Salmonella H Antiserum: Complete identification of a *Salmonella* isolate involves analysis of phase 1 and phase 2 antigens using H antiserum. For the complex pattern of analysis and procedures, consult appropriate references.⁹

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards: **BD Difco** Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards is used for screening and identifying the most commonly encountered *Salmonella* using a combination of polyvalent and single complex antiserum.

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

H Antigen(s)	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antiserum 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 Antiserum Spicer-Edwards 1 and 4 reacts with antigens 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 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 Antiserum Spicer-Edwards. Any antigen that reacts with all four sera should be checked for smoothness.

Slide Test Procedure

Salmonella O and Vi Antiserum

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.
- Negative control:** Dispense 1 drop of 0.85% sterile NaCl solution on an agglutination slide.
- From a solid agar medium, transfer a portion of a loopful of an isolated colony to each reaction area above and mix thoroughly.
- Positive control:** Dispense 1 drop of each **BD Difco** Salmonella O Antiserum to be tested on an agglutination slide. Add 1 drop of an appropriate **BD 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 Antiserum:** 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 Antiserum:** Prepare a 1:250 dilution by adding 0.1 mL reconstituted antiserum to 24.9 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 Antiserum x, z₁₅ and z₂₈:** Prepare a 1:125 dilution by adding 0.1 mL reconstituted antiserum to 12.4 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 2.4 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 Antiserum

- 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[1] 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 Antiserum**.
- 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 24.9 mL of 0.85% NaCl solution.
- Prepare 4 culture tubes (12 x 75 mm) for each test organism.
- Salmonella H Antiserum 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. **BD Difco** QC Antigens Salmonella may be used as a homologous control. Refer to the **BD 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 CLSI 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.
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.
- 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 **BD 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

1. 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.
2. Possible *Salmonella* isolates having inconsistencies in biochemical reactions and O and H antigen tests should be referred to a reference laboratory for further testing.
3. 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.
4. 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.
5. 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 **BD Difco** *Salmonella* O Antiserum Group A Factors 1,2,12 to test several suspicious colonies on a plate followed by testing with absorbed **BD Difco** *Salmonella* O Antiserum Factor 2 gives the needed balance of sensitivity and specificity.
6. 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.
7. There may exist common antigens between various "O" serogroups of *Salmonella*. As an example, **BD 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).
8. **BD 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*.
9. 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.
10. 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 **BD 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). Specificity is determined by demonstrating non-reactivity against non-related (heterologous) *Salmonella* groups.

Salmonella H Antisera

Sensitivity of **BD 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). Specificity is determined by demonstrating non-reactivity against non-related (heterologous) *Salmonella* groups.

AVAILABILITY: See page 15.

REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Old, D.C. 1992. Nomenclature of *Salmonella*. J. Med. Microbiol. 37:361-363.
5. Penner, J.L. 1988. International committee on systematic bacteriology taxonomic subcommittee on *Enterobacteriaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:223-224.
6. 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.
7. Wayne, L.G. 1991. Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:185-187.
8. 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.
9. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y.
10. 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.
11. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller. 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Isenberg and Garcia (ed.). 2004 (update, 2007). Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. U.S. Food and Drug Administration. 2001. Bacteriological analytical manual online. <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mm.html>>.
14. 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.

Technical Information: In the United States contact BD Technical Service and Support at 800-638-8663 or www.bd.com/ds.

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

Français

APPLICATION

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

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

Le **BD Difco** *Salmonella* Vi Antiserum (sérum Vi anti-*salmonella* **BD 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>diarizonae</i> (IIIb ou 3b)
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II ou 2)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV ou 4)
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa ou 3a)	<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 antisérum 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 antisérum 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. En raison de la relation antigène existant entre les genres de la famille *Enterobacteriaceae*, il est recommandé d'identifier biochimiquement l'isolat comme *Salmonella* avant de procéder au test de sérologie. 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'aggrégats 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. 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 **BD Difco** *Salmonella* O, H et Vi Antisera (sérum anti-*salmonella* O, H et Vi **BD Difco**) sont des antisérum de lapin polyclonaux lyophilisés, contenant environ 0,2% d'azide de sodium comme agent conservateur.

Les **BD Difco** *Salmonella* O Poly Antisera sont des antisérum polyvalents. Chaque antiserum est spécifique pour certains antigènes de sérogroupes. Lorsqu'ils sont correctement réhydratés et utilisés selon les recommandations, chaque flacon de **BD Difco** *Salmonella* O ou Vi Antisera contient suffisamment de réactif pour 60 tests. Les **BD 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 **BD Difco** *Salmonella* O Group Antisera sont spécifiques des facteurs principaux présents dans le séro groupe. Les **BD Difco** *Salmonella* O Factor Antisera sont spécifiques des facteurs des sérogroupes individuels. Lors de l'utilisation des **BD 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 antiserum aussi spécifique que pratique sans réduire les réactions homologues à un niveau non satisfaisant.

Les **Difco** *Salmonella* H Poly Antisera sont des antisérum 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'antiserum 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 antisérum groupés, polyvalents et des antisérum d'appoint supplémentaires pour identifier les antigènes H plus communs.

Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

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.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient de l'azide de sodium, qui est toxique par inhalation, contact avec la peau ou ingestion. Au contact d'un acide, un gaz très toxique est dégagé. Après tout contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau. L'azide de sodium peut réagir au contact du plomb et du cuivre des canalisations et former des azides métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, faire couler un volume d'eau important pour éviter l'accumulation d'azides.

Attention



H302 Nocif en cas d'ingestion. **P264** Se laver soigneusement après manipulation. **P301+P312** EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. **P501** Éliminer le contenu/récipient conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

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

La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions.

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

Jeter tout antiserum présentant un aspect trouble ou un précipité après la réhydratation ou le stockage, sauf s'il peut être clarifié par centrifugation ou filtration et si sa réactivité est correcte, avec des contrôles validés positifs et négatifs. Une turbidité visible est synonyme de contamination et, dans ce cas, l'antiserum doit être mis au rebut.

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 : **BD Difco** Salmonella O Antiserum A ; **BD Difco** Salmonella H Antiserum ; ou **BD 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 ; écouvillons ; 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

1. 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.
2. Agiter pendant 1 min par un mouvement de rotation de la lame, puis observer s'il se produit une réaction d'agglutination.
3. Si une agglutination se produit (autoagglutination), la culture n'est pas pure et ne peut pas être testée. Répiquer sur gélose non sélective, incubé et tester de nouveau le microorganisme comme expliqué aux étapes 1 et 2.
4. 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 **BD Difco** Salmonella O Antiserum 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 **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum individuels pour déterminer le sérotype spécifique auquel appartient l'isolat. Par soucis d'efficacité, tester en premier avec des **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum 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 **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si le résultat est positif, chauffer et retester avec **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si une agglutination se produit après ébullition avec **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi, l'isolat n'est vraisemblablement pas *Salmonella*. Si une agglutination ne se produit pas avec **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi après ébullition, tester les cultures portées à ébullition avec des **BD Difco** Salmonella O Antiserum 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 Antiserum Poly Groups A, B, C, D, E, F et G.

Test effectué avec	Salmonella O Antiserum 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 Antiserum		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 <i>Salmonella</i>		Tester les cultures portées à ébullition avec Salmonella O Antiserum individuels
					L'isolat à tester n'est pas une <i>Salmonella</i>
					L'isolat à tester n'est pas une <i>Salmonella</i>

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-1 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 **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum. Les sérogroupes les plus communs sont B, D et C₁. Par soucis d'efficacité, utiliser en premier les **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum pour ces sérogroupes.

Si l'isolat est positif avec le **BD Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I et Vi mais négatif avec les antisérums somatiques spécifiques, tester l'isolat avec le **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. S'il est positif avec le **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi, chauffer et retester avec le **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. S'il est positif après ébullition avec le **BD Difco** Salmonella O Antiserum Vi, l'isolat n'est vraisemblablement pas *Salmonella*. Si une agglutination ne se produit pas avec **BD Difco** Salmonella O Antiserum Vi après ébullition, tester les cultures portées à ébullition avec des **BD Difco** Salmonella O Antiserum 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 **BD 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 sérotype 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 Antiserum 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 Antiserum individuels
					L'isolat à tester n'est pas une <i>Salmonella</i>
					Pourrait être une <i>Salmonella</i> détectable en utilisant Salmonella O Antiserum Poly C, D, E, F ou G

Facteur de groupe Salmonella O et antisérums à simple facteur : Utiliser les **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum sélectionnés pour une identification supplémentaire des isolats. Une réaction croisée peut se produire entre sérogroupes à antigènes O. Cette liste partielle des **BD Difco** Salmonella O Group Antiserum 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 **BD Difco** Salmonella O Factor Antiserum sélectionnés. Les antisérums spécifiques absorbés pour un antigène identifiable dans un sérotype donné sont utilisés pour une identification supplémentaire. Dans l'exemple ci-dessus, les **BD Difco** Salmonella O Factor Antiserum 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 sérogroupage peut être effectué avec les **BD Difco** Polyvalent H Antiserum 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 **BD Difco** Salmonella H Antiserum 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 Antiserum Spicer-Edwards.

H Antigen(s)	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antiserum 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,s,t ; 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 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.

1. Déposer une goutte (35 µL) de culture antisérum à tester sur une lame à agglutination.
2. **Contrôle négatif** : Déposer une goutte de solution stérile de NaCl à 0,85 % sur une lame à agglutination.
3. Transférer une portion d'une pleine anse d'une colonie isolée, prélevée sur un milieu gélosé solide, dans chaque zone réactionnelle ci-dessus et agiter vigoureusement.
4. **Contrôle positif** : Déposer une goutte du **BD Difco** Salmonella O Antiserum à tester sur une lame à agglutination. Ajouter une goutte de **BD Difco** QC Antigen Salmonella ou de souches d'identification sérologique connue.
5. 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 la solution en tube

1. **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 %.
2. **Microorganisme à tester** : Il est souvent nécessaire d'augmenter la motilité du microorganisme de test. 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 pipette.

- 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-cervelle peut être utilisé avec une incubation à 35 °C pendant 4 à 6 h. Si un bouillon de soja tryptique est utilisé, incubé 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.
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)
4. **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 24,9 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, z₁₅ et z₂₈** : Préparer une dilution à 1 : 125 en ajoutant 0,1 mL d'antisérum reconstitué à 12,4 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 2,4 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 :

1. Préparer un tube de culture de 12 x 75 mm pour chaque microorganisme à tester.
2. **Antisérum dilué** : Distribuer 0,5 mL dans chaque tube.
3. **Isolat à tester** : Ajouter 0,5 mL au tube correspondant.
4. **Contrôle positif** : Ajouter 0,5 mL de contrôle positif d'antigène à un tube contenant 0,5 mL d'antisérum.
5. **Contrôle négatif** : Ajouter 0,5 mL de solution de NaCl à 0,85 % dans un tube contenant 0,5 mL d'antisérum.
6. Incuber tous les tubes dans un bain-marie à 50 °C ± 2 °C pendant 1 h.
7. Observer s'il se produit une réaction de floculation (agglutination).
8. 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

1. Préparer l'inversion de phase du milieu de motilité GI conformément aux instructions.
2. 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].
3. 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.
4. Inoculer en poussant les bords du milieu solidifié.
5. Incuber à une température allant de 35 à 37 °C pendant 24 h.
6. Transférer la croissance du bord de dissémination opposé au site d'inoculation dans un milieu liquide pour tester conformément aux étapes ci-dessous **Procédure d'essai en tube – Sérums anti-Salmonella H**.
7. Si la motilité n'est pas acceptable, passer à nouveau à travers le milieu à motilité GI.

Sérum anti-Salmonella H Spicer-Edwards :

1. 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.
2. **Dilution finale de l'antisérum à 1 : 1000** : Préparer en ajoutant 0,1 mL d'antisérum reconstitué (dilution de travail à 1 : 2) à 24,9 mL de solution de NaCl à 0,85 %.
3. Préparer quatre tubes à culture (12 x 75 mm) pour chaque microorganisme à tester.
4. **Sérums anti-Salmonella H Spicer-Edwards 1-4** : Ajouter 0,5 mL d'antisérum dilué aux tubes à culture.
5. **Microorganisme à tester** : Ajouter 0,5 mL à chaque tube.
6. Incuber tous les tubes dans un bain-marie à 50 °C ± 2 °C pendant 1 h.
7. 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.
8. 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 **BD Difco** QC Antigens *Salmonella* peuvent être utilisés comme témoin homologue. Pour des informations supplémentaires, se référer à la notice d'instructions des **BD 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 du CLSI et de la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

RESULTATS

Test sur lame

1. 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.		

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

Essai en tube

1. 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.		

2. Le contrôle positif doit présenter une agglutination de 3+ ou plus à la dilution du test de routine (routine test dilution, RTD).
 3. Le témoin négatif ne doit présenter aucune agglutination.
- Lors de l'utilisation du **BD Difco** *Salmonella* H Spicer-Edwards, comparer les résultats avec les motifs de floculation (agglutination) pour les schémas de Spicer-Edwards (voir tableau 3, page 4).

LIMITES DE LA PROCEDURE

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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 absorbé 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 **BD 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 **BD Difco** *Salmonella* O Antiserum absorbé de facteur 2.
6. 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.
7. Il peut exister des antigènes communs entre les divers sérogroupes « O » de *Salmonella*. Par exemple, le **BD 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).
8. Le **BD Difco** *Salmonella* O Antiserum Poly A-1 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*.
9. 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.
10. 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 **BD 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). 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 **BD 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). La spécificité est déterminée en démontrant une absence de réactivité contre les groupes non-apparentés de *Salmonella* (hétérologues).

CONDITIONNEMENT : voir page 15.

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

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site www.bd.com/ds.

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

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

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

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

BD 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 selbstbeschränkender 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:

<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I oder 1)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb oder 3b)
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II oder 2)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV oder 4)
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa oder 3a)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (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 umgibt 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 hitzelablen 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. Da zwischen Genera der Familie der *Enterobacteriaceae* antigene Verwandtschaften existieren, wird empfohlen, dass das Isolat vor den serologischen Tests biochemisch als *Salmonella* identifiziert wird. 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. 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 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

BD Difco *Salmonella* O, H und Vi Antisera sind lyophilisierte, polyklonale Kaninchen-Antisera, die ca. 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel enthalten.

BD Difco *Salmonella* O Poly Antisera sind polyvalente Antisera. Jedes Antiserum ist spezifisch für bestimmte Serogruppen-Antigene. Bei korrekter Rehydrierung und vorschriftsmäßiger Anwendung enthält jedes Fläschchen **BD Difco** *Salmonella* O oder Vi Antisera eine ausreichende Reagenzienmenge für 60 Tests. **BD 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.

BD Difco *Salmonella* O Group Antisera sind spezifisch für die in der Serogruppe vorhandenen Hauptfaktoren. **BD Difco** *Salmonella* O Factor Antisera sind spezifisch für die Faktoren der einzelnen Serogruppen. Bei Verwendung von **BD Difco** *Salmonella* O Group Antisera sind Kreuzreaktionen möglich, da die Serogruppen Nebengruppen-Antigene gemeinsam nutzen können. **BD 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 **BD Difco** *Salmonella* H Poly Antisera sind spezifisch für bestimmte flagellare Antigene. Jedes Fläschchen **BD Difco** *Salmonella* H Antisera enthält ausreichend Reagenz für 150 bis 1500 Tests, je nach verwendetem Antiserum. **BD 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. **BD 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.

Dieses Produkt 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.

WARNUNG: Dieses Produkt enthält Natriumazid. Sehr giftig beim Einatmen, bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Bei Kontakt mit Säure entstehen hochgiftige Gase. Bei Kontakt mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit sehr viel Wasser nachspülen, um Ansammlungen von Azid zu vermeiden.

Achtung



H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. **P264** Nach Gebrauch gründlich waschen. **P301+P312** BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

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

Das Verfallsdatum gilt für das im unversehrten Behälter aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften. Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.

Trübe Antisera oder solche, die nach Rehydrierung oder Aufbewahrung Niederschläge zeigen, sind zu entsorgen, es sei denn, sie können durch Zentrifugieren und Filtrieren geklärt werden und zeigen einwandfreie Reaktivität mit validierten positiven und negativen Kontrollen. Starke Trübung ist ein Hinweis auf Kontamination und Antisera, die diese aufweisen, sollten entsorgt werden.

PROBENENTNAHME 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: **BD Difco** *Salmonella* O Antisera; **BD Difco** *Salmonella* H Antisera oder **BD 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 **BD 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 Phage 15 und dann mit Phage 34 lysogenisiert. Diese Stämme zählen jetzt zur Gruppe E₁.²

Wenn es zu einer Agglutination kommt, einzelne **BD Difco** *Salmonella* O Group Antisera zur Bestimmung der spezifischen Serogruppe, zu der das Isolat gehört, verwenden. Für besseren Effizienz zunächst mit einzelnen **BD 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 **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Vi testen. Wenn möglich, erhitzen und mit **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Vi erneut testen. Wenn es nach dem Kochen mit **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Vi zu einer Agglutination kommt, handelt es sich bei dem Isolat wahrscheinlich nicht um *Salmonella*. Wenn es nach dem Kochen mit **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Vi nicht zu einer Agglutination kommt, die gekochte Kultur mit einzelnen **BD 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 <i>Salmonella</i> O Antisera	<i>Salmonella</i> O Antiserum Vi			
Testergebnis	+ mit einem <i>Salmonella</i> O Antiserum (erforderlich)	+	–		
Test mit	↓	Erhitzen und erneut mit <i>Salmonella</i> O Antiserum Vi		↓	↓
Testergebnis	↓	+	–	↓	↓
Testergebnis oder nächste Maßnahme	Nachweis des <i>Salmonella</i> H Antigen	Testisolat ist not kein <i>Salmonella</i>	Gekochte Kultur mit individuellen testen <i>Salmonella</i> O Antisera	Testisolat ist not kein <i>Salmonella</i>	Testisolat ist not 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 **BD Difco** *Salmonella* O Group Antisera zu identifizieren. Die gängigsten Serogruppen sind B, D und C₁. Zur besseren Effizienz zunächst mit **BD Difco** *Salmonella* O Group Antisera für diese Serogruppen testen.

Wenn das Ergebnis nach dem Kochen mit **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Poly A-I & Vi positiv ausfällt, jedoch negativ mit den spezifischen somatischen Antisera, das Isolat mit **BD Difco** *Salmonella* O Antiserum Vi testen. Wenn möglich, erhitzen und mit **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Vi erneut testen. Wenn das Ergebnis nach dem Kochen mit **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Vi positiv ausfällt, handelt es sich bei dem Isolat wahrscheinlich nicht um *Salmonella*. Wenn es nach dem Kochen mit **BD Difco** *Salmonella* Antiserum Vi nicht zu einer Agglutination kommt, die gekochte Kultur mit einzelnen **BD 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 **BD 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.

Test mit	Salmonella O Antiserum Poly A-I und Vi				
Testergebnis	+				
Test mit	Individuellen <i>Salmonella</i> O Antisera				
Testergebnis	+	–			
Test mit	↓	<i>Salmonella</i> O Antiserum Vi			
Testergebnis	↓	+	–	↓	↓
Test mit	↓	Erhitzen und erneut mit <i>Salmonella</i> O Antiserum Vi		↓	↓
Testergebnis	↓	+	–	↓	↓
Testergebnis oder nächste Maßnahme	Nachweis des <i>Salmonella</i> H Antigen	Testisolat ist not kein <i>Salmonella</i>	Gekochte Kultur mit individuellen testen <i>Salmonella</i> O Antisera	Testisolat ist not kein <i>Salmonella</i>	Vielleicht ein <i>Salmonella</i> stellbar durch die Verwendung von <i>Salmonella</i> O Antisera Poly C, D, E, F oder G

Salmonella O Group Factor und Single Factor Antisera: Ausgewählte **BD 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 **BD 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 **BD Difco** Salmonella O Factor Antisera verwenden. Absorbierte Antiseren, die spezifisch sind für ein identifizierbares Antigen in einer bestimmten Serogruppe, werden zur weiteren Identifizierung des Isolats verwendet. In dem Beispiel oben können **BD 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 **BD 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-Antiseren, 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-Antiseren. Das komplexe Analyse- und Verfahrensmuster einschlägigen Quellen entnehmen.⁹

Salmonella H Antisera Spicer-Edwards: BD 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 Antiseren 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; 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 Antiserums auf einen Agglutinations-Objektträger geben.
- Negative Kontrolle:** Einen Tropfen 0,85%iger NaCl-Lösung auf einen Agglutinations-Objektträger geben.
- Von einem festen Agarmedium einen Teil oder eine Öse voll Wachstum einer isolierten Kolonie auf die oben genannten Reaktionsbereiche geben und gründlich durchmischen.
- Positive Kontrolle:** Einen Tropfen des zu testenden **BD Difco** Salmonella O Antiserum auf einen Agglutinations-Objektträger geben. 1 Tropfen eines geeigneten **BD 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 Antigen 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 Antiseren sind als Arbeitslösung 1:2 zu betrachten. Die Verdünnungen wie folgt vorbereiten und am Vorbereitungs-Tag aufbrauchen. Nicht verwendete Anteile entsorgen.
 - Die meisten **Salmonella H Antisera:** Eine Verdünnung im Verhältnis 1:250 vorbereiten. Hierzu 0,1 mL rekonstituiertes Antiserum zu 24,9 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, z₁₅ und z₂₈:** Eine Verdünnung im Verhältnis 1:125 vorbereiten. Hierzu 0,1 mL rekonstituiertes Antiserum zu 12,4 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 2,4 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 Kontrollantigen hinzufügen.
- Negative Kontrolle:** Einem Röhrchen mit 0,5 mL des Testisolats 0,5 mL 0,85%ige NaCl-Lösung hinzufügen.
- Alle Röhrchen 1 h lang im Wasserbad bei 50 ± 2 °C inkubieren.
- Auf Flockenbildung (Agglutination) überprüfen.
- Den Röhrchentest mit einem phasenumgekehrten Testorganismus wiederholen (siehe das Verfahren für die **Phasenumkehr** unten).

Phasenumkehr

- Das phasenumgekehrte Medium für das Motilitäts-GI-Medium gemäß den Anweisungen vorbereiten.
- 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].
- 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.
- Durch Einstechen am Rand des verfestigten Mediums inokulieren.
- 24 h lang bei 35–37 °C inkubieren.
- Wachstum vom Verbreitungsrand gegenüber der Inokulationsstelle gemäß den Schritten unter „**Röhrchen-Testverfahren – Salmonella H Antisera**“ auf ein Flüssigkeitsmedium übertragen.
- Ist die Motilität nicht ausreichend, erneut durch ein Motilitäts-GI-Medium passieren lassen.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards

- Testorganismus und die Antiserumverdünnung im Verhältnis 1:2, wie oben unter „Röhrchen-Testverfahren“ beschriebene, vorbereiten.
- Endgültige 1:1000-Verdünnung des Antiserums:** Vorbereiten durch Hinzufügen von 0,1 mL rekonstituiertem Antiserum (Arbeitsverdünnung 1:2) zu 24,9 mL 0,85%iger NaCl-Lösung.
- 4 Kulturröhrchen (12 x 75 mm) für jeden Testorganismus vorbereiten.
- Salmonella H Antisera Spicer-Edwards 1-4:** 0,5 mL des verdünnten Antiserums in die Kulturröhrchen geben.
- Testorganismus:** 0,5 mL in jedes Röhrchen geben.
- Röhrchen eine Stunde lang im Wasserbad bei 50 ± 2 °C inkubieren.
- Aus dem Wasserbad entfernen. Wenn sich die Röhrchen im Wasserbad befinden oder aus dem Wasserbad zum Ablesen der Reaktionen entfernt werden, übermäßiges Schütteln vermeiden.
- 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. **BD Difco** QC Antigens *Salmonella* kann als homologe Kontrolle verwendet werden. Nähere Anweisungen finden Sie auf der Packungsbeilage zu **BD 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 CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

ERGEBNISSE

Objektträgeretest

- 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.		

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

Röhrchentest

- 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.		

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

Bei Verwendung von **BD Difco** *Salmonella* H Spicer-Edwards die Ergebnisse mit den Flockenbildungsmustern (Agglutinationsmustern) des Spicer-Edwards-Schemas vergleichen (siehe Tabelle 3, Seite 6).

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

- 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.
- Mögliche *Salmonella*-Isolate mit Inkonsistenzen in den chemischen Reaktionen und O- und H-Antigentests sollten für weitere Tests an ein Referenzlabor gesendet werden.
- 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.
- Grobe Kultursolate 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.
- Beim Objektträger-Agglutinationsverfahren zum Testen von O-Antigenen wird das Testen mehrerer Kolonien empfohlen solange 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 **BD Difco** *Salmonella* O Antiserum Group A Factors 1, 2, 12 zum Testen mehrerer verdächtig Kolonien auf einer *Platte* und der anschließende Test mit absorbiertem **BD Difco** *Salmonella* O Antiserum Factor 2 gewährleistet das notwendige Gleichgewicht zwischen Sensibilität und Spezifität.
- 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.
- Zwei *Salmonella* Vielzahl von *Salmonella*-O-Serogruppen können gemeinsame Antigene enthalten sein. **BD 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).

- BD Difco Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi** wurde mit 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.
- Die Röhrcchen-Agglutinationsmethode wird für H-Antigentests empfohlen, da es zu Kreuzreaktionen mit somatischen Antigenen in den bei der Objektträger-Methode verwendeten Verdünnungen kommen kann.
- Bei einem Röhrcchentest 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 Röhrcchentests**“ aufgeführt.

LEISTUNGSMERKMALE

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

Salmonella H Antiserum

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

LIEFERBARE PRODUKTE: siehe Seite 15.

LITERATUR: S. „References“ im englischen Text.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder www.bd.com/ds.

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

Italiano

USO PREVISTO

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

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

BD 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>diarizonae</i> (IIIb o 3b)
<i>S. enterica</i> ssp. <i>salamae</i> (II o 2)	<i>S. enterica</i> ssp. <i>houtenae</i> (IV o 4)
<i>S. enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> (IIIa o 3a)	<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 colture, 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. Poiché esistono relazioni antigeniche tra generi della famiglia *Enterobacteriaceae*, è consigliabile che l'isolato sia identificato biochimicamente come *Salmonella* prima dei test sierologici. 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. 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

BD Difco Salmonella O, H e Vi Antiserum sono antisieri policlonali di coniglio liofilizzati, contenenti circa 0,2% di sodio azide come conservante.

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

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

BD Difco Salmonella H Poly Antiserum sono antisieri polivalenti specifici per determinati antigeni flagellati. Ogni fiala di **BD Difco Salmonella H Antiserum** contiene reagente sufficiente per effettuare tra i 150 e i 1500 test, secondo l'antisiero impiegato. **BD Difco Salmonella H Antiserum** sono assorbibili o non assorbibili specificatamente per antigeni di fase 1 o di fase 2. **BD Difco Salmonella H Antiserum 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*.

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.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene sodio azide. La sodio azide è tossica se inalata, a contatto con la pelle o ingerita. A contatto con acido, libera gas estremamente tossici. In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente e abbondantemente con acqua. La sodio azide può reagire con il piombo e il rame delle tubature, formando azidi metalliche altamente esplosive. Eliminare la sodio azide facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi per impedire l'accumulo di azidi.

Attenzione



H302 Nocivo se ingerito. **P264** Lavarsi accuratamente dopo l'uso. **P301+P312** IN CASO DI INGESTIONE: In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

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

La data di scadenza si riferisce al prodotto nel contenitore intatto e conservato come prescritto.

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

Eliminare gli antisieri torbidi o che presentano un precipitato dopo la reidratazione o la conservazione, a meno che non possano essere chiarificati tramite centrifugazione o filtrazione e mostrino una reattività adeguata a controlli positivi e negativi validati. Gli antisieri che presentano una torbidità macroscopica sono contaminati e pertanto devono essere eliminati.

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 coltura 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 isolati e per impedire lo sviluppo eccessivo dei microorganismi concorrenti. Per suggerimenti sulle procedure di isolamento della *Salmonella* dai cibi, consultare gli opportuni riferimenti.^{13,14} Stabilire che la coltura 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: **BD Difco Salmonella O Antiserum**; **BD Difco Salmonella H Antiserum**; o **BD 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 detersivi o altro.

Per ricostituire, 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

- 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.
- Rotare la piastra per 1 min e poi osservare l'agglutinazione.
- Se si verifica agglutinazione (autogglutinazione), 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.
- Se l'agglutinazione non si verifica, procedere con il test sull'organismo.

Scelta degli antisieri

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

<u>Salmonella Group Antiserum</u>	<u>Gruppi somatici presenti</u>
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 lisenizzate dal fago 15 e successivamente dal fago 34. Queste famiglie sono ora classificate nel gruppo E₁.²

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

Se non si verifica agglutinazione con **Poly A** o **B**, effettuare il test sull'isolato con **BD Difco Salmonella Antiserum Vi**. In caso di risultato positivo, riscaldare ed effettuare nuovamente il test con **BD Difco Salmonella Antiserum Vi**. In caso di agglutinazione dopo la bollitura con **BD Difco Salmonella Antiserum Vi**, l'isolato probabilmente non è *Salmonella*. Se, dopo la bollitura, non si verifica agglutinazione con **BD Difco Salmonella Antiserum Vi**, effettuare il test sulla coltura bollita con il **BD Difco Salmonella O Antiserum** singolo. Se i risultati dei 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 Antiseri Poly Groups A, B, C, D, E, F e G.

Prova con	Salmonella O Antiseri Poly Groups A, B, C, D, E, F e G				
Risultati di prova	+		– con Poly A or B		– con Poly C, D, E, F and G
Prova con	Salmonella O Antiseri individuali	Salmonella O Antiserum Vi			
Risultati di prova	+ con un Salmonella O Antiserum (necessario)	+		–	
Prova con		Riscaldamento e ripetizione della 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 Antiseri 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 **BD Difco** Salmonella O Group Antiseri. I sierogruppi più diffusi sono B, D e C₁. Per ragioni di efficacia, per questi sierogruppi utilizzare prima **BD Difco** Salmonella O Group Antiseri.

Se l'isolato è positivo al **BD Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I e Vi ma è negativo all'antisiero somatico specifico, effettuare il test sull'isolato con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Se positivo al **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi, riscaldare e ripetere il test al **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Se positivo al **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi dopo la bollitura, l'isolato probabilmente non è *Salmonella*. Se, dopo la bollitura, non si verifica agglutinazione con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi, effettuare il test sulla coltura bollita con il **BD Difco** Salmonella O Antiseri 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 **BD 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. È 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 Antiseri individuali				
Risultati di prova	+	–			
Prova con		Salmonella O Antiserum Vi			
Risultati di prova		+	–		
Prova con		Riscaldamento e ripetizione della 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 Antiseri 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 Antiseri Poly C, D, E, F o G

Salmonella O Group Factor e Single Factor Antiseri: Utilizzare il **BD Difco** Salmonella O Group Antiseri 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 **BD Difco** Salmonella O Group Antiseri.

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 **BD Difco** Salmonella O Factor Antiseri 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 **BD Difco** Salmonella O Factor Antiseri.

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

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

Salmonella H Poly Group Antiseri	Flagellar Antigens Present
Salmonella H Antiserum Poly a-z Salmonella H Antiserum Poly A Salmonella H Antiserum Poly B Salmonella H Antiserum Poly C Salmonella H Antiserum Poly D Salmonella H Antiserum Poly E	Gruppi EN,G,L,Z ₄ , complessi 1 e a-k,r-z,Z ₆ ,Z ₁₀ ,Z ₂₉ Gruppi a,b,c,d,i,Z ₁₀ ,Z ₂₉ Gruppi eh,en,ex,enz ₁₅ , complesso G Gruppi k,l,r,y,z,Z ₄ Gruppi Z ₃₅ ,Z ₃₆ ,Z ₃₇ ,Z ₃₈ ,Z ₃₉ ,Z ₄₁ ,Z ₄₂ 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 Antiseri 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 Antiseri Spicer-Edwards: **BD Difco** Salmonella H Antiseri Spicer-Edwards è utilizzato per ricercare e identificare le *Salmonella* più comunemente riscontrate utilizzando una combinazione di antisieri polyvalenti e di complesso singolo.

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

H Antigen(s)	Salmonella H Antiseri Spicer-Edwards				H Antigen(s)	Salmonella H Antiseri 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	–	+	+	–

*Il componente complesso G della Salmonella H Antiseri 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,Z₃₂.

Oservare che nessun antigene sia positivo con tutti i quattro Salmonella H Antiseri 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 Antiseri

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

1. Dispensare su una piastra di agglutinazione 1 goccia (35 µL) dell'antisiero da analizzare.
2. **Controllo negativo:** Dispensare 1 goccia di soluzione sterile allo 0,85% di NaCl su una piastra di agglutinazione.
3. Da un terreno agar solido, trasferire una parte di un'aliquota di una colonia isolata su ogni area di reazione di cui sopra e miscelare completamente.
4. **Controllo positivo:** Dispensare su una piastra di agglutinazione 1 goccia di **BD Difco** Salmonella O Antiserum da analizzare. Aggiungere 1 goccia di un **BD Difco** QC Antigen Salmonella adatto o di colture di provvista di identificazione sierologica nota.
5. Rotolare 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

1. **Soluzione fisiologica formalinizzata allo 0,6%:** Preparare aggiungendo 6 mL di formaldeide per 1000 mL di soluzione sterile allo 0,85% di NaCl.
2. **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 sospensione 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.
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**).
4. **Salmonella H Antiseri:** Gli antisieri ricostituiti sono considerati una soluzione di lavoro 1:2. Preparare le soluzioni nei modi qui indicati e utilizzare il giorno stabilito. Eliminare le aliquote non utilizzate.
 - Per la maggior parte di **Salmonella H Antiseri:** Preparare una soluzione 1:250 aggiungendo 0,1 mL di antisiero ricostituito a 24,9 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 Antiseri x, z₁₅ e z₂₈:** Preparare una soluzione 1:125 aggiungendo 0,1 mL di antisiero ricostituito a 12,4 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 2,4 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 Antiseri

1. Preparare una provetta da 12 x 75 mm per ogni organismo da testare.
2. **Antisiero diluito:** Dispensare 0,5 mL in ogni provetta.
3. **Isolato di prova:** Aggiungere 0,5 mL in una provetta adatta.
4. **Controllo positivo:** Aggiungere 0,5 mL di controllo positivo dell'antigene in una provetta contenente 0,5 mL di antisiero.
5. **Controllo negativo:** Aggiungere 0,5 mL di soluzione allo 0,85% di NaCl contenente 0,5 mL di isolato di prova.
6. Incubare tutte le provette a bagnomaria a 50 ± 2 °C per 1 h.
7. Verificare la flocculazione (agglutinazione).
8. 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

1. Preparare il supporto di inversione di fase Motility GI Medium seguendo le istruzioni.
2. Preparare l'antisiero opposto alla fase desiderata. Per esempio, l'incubazione di *Salmonella* Typhimurium fase 1[1] in GI Motility Medium contenente antisiero i consente la crescita e la diffusione di S. Typhimurium fase 2 [1,2].
3. 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.
4. Inoculare perforando la sommità del supporto solidificato.
5. Incubare a 35–37 °C per 24 h.
6. 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 Antiseri**.
7. Se la mobilità non è accettabile, ripassare in Motility GI Medium.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards

1. Preparare l'organismo di prova e la soluzione 1:2 di antisiero come descritto sopra in Preparazione del test in provetta
2. **Diluizione finale 1:1.000 di antisiero:** Preparare aggiungendo 0,1 mL di antisiero ricostituito (diluizione di lavoro 1:2) a 24,9 mL di soluzione allo 0,85% di NaCl.
3. Preparare 4 provette di colture (12 x 75 mm) per ogni organismo di prova.
4. **Salmonella H Antiseri Spicer-Edwards 1-4:** Aggiungere 0,5 mL dell'antisiero diluito alle provette di coltura.
5. **Organismo di prova:** Dispensare 0,5 mL in ogni provetta.
6. Incubare tutte le provette a bagnomaria a 50 ± 2 °C per 1 h.
7. Rimuovere dal bagnomaria. Evitare di agitare eccessivamente le provette quando sono a bagnomaria o quando vengono rimosse dal bagnomaria prima di verificare le reazioni.
8. 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. **BD Difco** QC Antigeni

Salmonella può essere utilizzato come controllo per omologhi. Per ulteriori informazioni, consultare l'allegato nella confezione di **BD Difco** QC Antigen 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 CLSI in merito.

RISULTATI

Test su vetrino

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

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 cultura 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 antigene 2 e maggiori quantità di antigeni 1 e 12. Utilizzando **BD Difco** Salmonella O Antiserum Group A Factors 1,2,12 non assorbito, per analizzare colonie sospese su una piastra e analizzando successivamente con **BD 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 agglutinationi 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, **BD 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. **BD 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 Antiserum e Salmonella Antiserum Vi: La sensibilità di **BD Difco** Salmonella O Antiserum 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). La specificità è determinata dimostrando la non reattività con gruppi non legati alla *Salmonella* (eterologhi).

Salmonella H Antiserum

La sensibilità di **BD Difco** Salmonella H Antiserum 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). La specificità è determinata dimostrando la non reattività con gruppi non legati alla *Salmonella* (eterologhi).

DISPONIBILITÀ: vedere pagina 15.

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com/ds.

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

Español

USO PREVISTO

BD Difco Salmonella O Antiserum (antisueri per *Salmonella* O **BD Difco**) se utilizan en las pruebas de aglutinación en portaobjetos para la identificación de *Salmonella* mediante antígenos somáticos (O).

BD Difco Salmonella H Antiserum (antisueri per *Salmonella* H **BD Difco**) se utilizan en las pruebas de aglutinación en tubo para la identificación de *Salmonella* mediante antígenos flagelares (H).

BD Difco Salmonella Vi Antiserum (antisero per *Salmonella* Vi **BD 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. 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>diarizonae</i> (IIIb o 3b)
<i>S. enterica</i> subespecie <i>salamae</i> (II o 2)	<i>S. enterica</i> subespecie <i>houtenae</i> (IV o 4)
<i>S. enterica</i> subespecie <i>arizonae</i> (IIIa o 3a)	<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 *salamae* 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. Como existen relaciones antigénicas entre los géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, se recomienda que antes del análisis serológico se identifique bioquímicamente el aislado como *Salmonella*. 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 avididad).

Dado que el microorganismo (antígeno) puede aglutinarse con un anticuerpo producido como respuesta a alguna otra especie, son posibles las reacciones heterólogas. Dichas reacciones imprevistas y posiblemente impredecibles pueden causar confusión en la identificación serológica. Por consiguiente, un organismo 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 flocculación no firme que puede suspenderse nuevamente con facilidad.

REACTIVOS

BD Difco Salmonella O Antiserum, **BD Difco** Salmonella H Antiserum y **BD Difco** Salmonella Vi Antiserum son antisueros de conejo policlonales liofilizados que contienen aproximadamente 0,2% de azida sódica como conservante.

BD Difco Salmonella O Poly Antiserum son antisueros polivalentes. Cada antisero es específico para determinados antígenos de serogrupo. Cuando se rehidrata correctamente y utiliza de la manera recomendada, cada frasco de **BD Difco** Salmonella O Antiserum o **BD Difco** Salmonella Vi Antiserum contiene suficiente reactivo para 60 pruebas. **BD Difco** Salmonella O Poly A-I Antiserum y **BD Difco** Salmonella Vi Antiserum se preparan con cepas representativas de estos serogrupos y no se absorben. Pueden presentar reacción cruzada debido a antígenos O en común.

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

BD Difco Salmonella H Poly Antiserum son antisueros polivalentes específicos para determinados antígenos flagelares. Cada frasco de **BD Difco** Salmonella H Antiserum contiene suficiente reactivo para realizar 150 – 1500 pruebas, según el antisero utilizado. **BD Difco** Salmonella H Antiserum son absorbidos o no, de manera específica, para los antígenos de fase 1 o 2. **BD Difco** Salmonella H Antiserum 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*.

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.

ADVERTENCIA: Este producto contiene azida sódica. La azida sódica es tóxica en caso de inhalación, contacto con la piel e ingestión. El contacto con ácidos libera un gas muy tóxico. En caso de contacto con la piel, lavar de inmediato el área afectada con abundante agua. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar el material por el desagüe, utilizar un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azidas.

Atención



H302 Nocivo en caso de ingestión. **P264** Lavarse concienzudamente tras la manipulación. **P301+P312** EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLÓGICA o a un médico, lavar de inmediato el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

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

La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada.

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

Descartar los antisueros que tengan turbidez o que presenten precipitados después de la rehidratación o el almacenamiento a menos que se puedan aclarar por centrifugado o filtración y demuestren una reactividad correcta con controles positivos y negativos validados. Una turbidez macroscópica indica contaminación; por lo tanto, esos antisueros deben descartarse.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras clínicas: *Salmonella* puede recuperarse de medios de diferenciación selectivos tales como el agar específico 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: **BD Difco** Salmonella O Antisera; **BD Difco** Salmonella H Antisera; o **BD 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 (herviendo); 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 reconstituídos 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) comienza con **BD Difco** Salmonella O Antisera Poly A hasta Poly G, que incluye lo siguiente:

Antisueros de grupo Salmonella	Grupos somáticos presentes
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

*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 **BD Difco** Salmonella O Group Antisera individuales para determinar el serogrupo específico al que pertenece el aislado. Por motivos de eficacia, analizar primero con **BD 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 **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si el resultado es positivo, calentar y repetir la prueba con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si se produce aglutinación después de hervir con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi, es probable que el aislado no sea *Salmonella*. Si no se produce aglutinación con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi después de hervir, analizar el cultivo hervido con **BD 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				
	+	– con Poly A or 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 **BD Difco** Salmonella O Group Antisera. Los serogrupos más comunes son B, D y C₁. Para motivos de eficacia, primero utilizar **BD Difco** Salmonella O Group Antisera para dichos serogrupos.

Si el aislado es positivo con **BD Difco** Salmonella O Antiserum Poly A-I y Vi pero negativo con los antisueros somáticos específicos, analizar el aislado con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si se obtiene un resultado positivo con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi, calentar y repetir la prueba con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi. Si se obtiene un resultado positivo con **BD Difco** Salmonella O Antiserum Vi después de hervir, es posible que el aislado no sea *Salmonella*. Si no se produce aglutinación con **BD Difco** Salmonella Antiserum Vi después de hervir, analizar el cultivo hervido con **BD 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 **BD 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>	Puede ser <i>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 **BD 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 **BD 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 **BD 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 **BD 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 **BD 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,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 antígenos 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: **BD 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 2 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,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.

1. Colocar 1 gota (35 µL) de cada antisuero a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación.
2. **Control negativo:** Colocar 1 gota de solución de NaCl al 0,85% estéril en un portaobjetos de aglutinación.
3. Desde un medio de agar sólido, transferir una parte de un asa de una colonia aislada a cada área de reacción anterior y mezclar bien.
4. **Control positivo:** Colocar 1 gota de cada **BD Difco** Salmonella O Antiserum a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación. Añadir 1 gota de **BD Difco** QC Antigen Salmonella apropiado o de cultivos de referencia de identificación serológica conocida.
5. 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 24,9 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 Antiserum x, z₁₅ y z₂₈:** Preparar una dilución de 1:125 añadiendo 0,1 mL de antisuero reconstituido a 12,4 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 2,4 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:** Dosisificar 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[f] 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 24,9 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 Antiserum 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. **BD Difco QC Antigen Salmonella** puede utilizarse como control homólogo. Para más instrucciones, consultar el folleto de **BD Difco QC Antigen 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 CLSI 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 **BD 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.
- 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 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 **BD Difco Salmonella O Antiserum Group A** no absorbido, factores 1,2,12, para analizar varias colonias presuntas en una placa, seguido del análisis con **BD Difco Salmonella O Antiserum absorbido**, factor 2, otorga el equilibrio necesario de sensibilidad y especificidad.
- 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.
- Pueden existir antígenos en común entre diversos serogrupos "O" de *Salmonella*. Por ejemplo, **BD 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).
- BD 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.
- La técnica de aglutinación en tubo se recomienda para el análisis de antígenos H porque pueden ocurrir reacciones cruzadas con antígenos somáticos en las diluciones utilizadas en la técnica en portaobjetos.
- 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 Antiserum y Salmonella Antiserum Vi: La sensibilidad de **BD Difco Salmonella O Antiserum** 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). 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 **BD Difco Salmonella H Antiserum** 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). La especificidad se determina al demostrar la falta de reactividad frente a grupos no relacionados (heterólogos) de *Salmonella*.

DISPONIBILIDAD: véase página 15.

REFERENCIAS: Ver "Referencias" en el texto en inglés.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD o visite www.bd.com/ds.

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

REF	Product / Produit / Produkt / Prodotto / Producto	Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologue Kulturen / Culture 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
229491	Salmonella O Antiserum Group C1 Factors 6,7	C	Schleissheim 4,12,27
229501	Salmonella O Antiserum Group C2 Factors 6,8		Kentucky 8,20
230161	Salmonella O Antiserum Group C3 Factors (8), 20		Thompson 6,7,14
226621	Salmonella O Antiserum Factor 20		Newport 6,8
226611	Salmonella O Antiserum Factor 14		Virginia 8
228161	Salmonella O Antiserum Factor 7		
229511	Salmonella O Antiserum Group D1 Factors 1,9,12	D	Enteritidis 1,9,12
230171	Salmonella O Antiserum Group D2 Factors (9), 46		Typhi 9,12,(Vi)
228181	Salmonella O Antiserum Factor 9		Pullorum 1,9,12
			Haarlem (9),46

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 Senftenberg 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		
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	I	Gaminara 16
222631	Salmonella O Antiserum Group I Factor 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

REF 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; Schleisheim 4,12,2Z	E	Anatum 3,10; London 3,10,26; Newington 3,15; Illinois {3},{15},34; Senftenberg 1,3,19
		L	Minnesota 21,26

REF 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}

REF 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

REF 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 3	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

REF 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	Niarembé {1},44	Y	Dahlem 48ab; Djakarta 48abc
W	Devesoir 45ab; Dugbe 45ac	Z	Wassenaar 40abc; Greenside 50abd
X	Bergen {1},47ab; Kaolack {1},47ac		

REF 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	reforest 1,51; Haarlem 51	54	Uccle 54
52	Utrecht 52	55	Tranoroa 55
53	Humber 1,53		

REF 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 5
57	Locarno 57	60	Luton 60
58	Basel 58	61	Eilbek 61

REF 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.

REF	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; Sentenberg 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 I,v; London I,v; Worthington I,w; Livingstone I,w; Morocco I,z ₁₃ ,z ₂₈ ; Javiana I,z ₂₈ ; Rutgers I,z ₄₀ ; LZ ₁₉ , IZ ₁₃ , IZ ₁₃
222711	Salmonella H Antiserum L Complex		
225541	Salmonella H Antiserum w		
225611	Salmonella H Antiserum z ₂₈	1 Complex	Newport var. puertorico 1,2; Thompson var. berlin 1,5 3,10;1,6 1,6; Madelia 1,7
222721	Salmonella H Antiserum 1 Complex		
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	EN Complex	Abortusequi e,n,x; Salinatis (PC 230) e,n,z ₁₅
222701	Salmonella H Antiserum EN Complex		
225551	Salmonella H Antiserum x		
225571	Salmonella H Antiserum z ₁₅	Z ₄ Complex	Cerro z ₄ ,z ₂₃ ; Duesseldorf z ₄ ,z ₂₄ ; Tallahassee Z ₄ ,z ₃₂
222781	Salmonella H Antiserum Z ₄ Complex		
225621	Salmonella H Antiserum z ₃₂		
225581	Salmonella H Antiserum z ₂₃	h	Reading e,h
225451	Salmonella H Antiserum h		
222731	Salmonella H Antiserum eh	Spicer-Edwards	Paratyphi A a Paratyphi B b Choleraesuis c Paratyphi C c S. typhi 901 d Reading e,h 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 Seftenberg g,s,t
222651	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 1		
222661	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 2		
222671	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 3		
222681	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 4		
228201	Salmonella H Antiserum a		
228211	Salmonella H Antiserum b		
228221	Salmonella H Antiserum c		
228231	Salmonella H Antiserum d		
228241	Salmonella H Antiserum i		
222741	Salmonella H Antiserum k		
222751	Salmonella H Antiserum r		
222761	Salmonella H Antiserum y		
222771	Salmonella H Antiserum z		
222791	Salmonella H Antiserum z ₁₀		
222801	Salmonella H Antiserum z ₂₉		
224731	Salmonella H Antiserum z ₆		

REF 225391 Salmonella H Antiserum Poly A (Groups a, b, c, d, i, z₁₀ and z₂₉) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologe Kulturen / Culture 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		

REF 225401 Salmonella H Antiserum Poly B (Groups eh, en, enx, enz₁₅ and G complex) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologe Kulturen / Culture 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	Sentenberg
f,g,t	Berta	g,t	Budapest
g,m	Enteritidis	m,t	Oranienburg
g,m,q	Bledgam		

REF 225411 Salmonella H Antiserum Poly C (Groups k, l, r, y, z and z₄) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologe Kulturen / Culture 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	Madelaia
l,z ₁₃	lz ₁₉ , IZ 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

REF 225421 Salmonella H Antiserum Poly D (Groups z₃₅, z₃₆, z₃₇, z₃₈, z₃₉, z₄₁ and z₄₂) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologe Kulturen / Culture 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

REF 225431 Salmonella H Antiserum Poly E (Groups 1 Complex, z₆) Homologous Cultures Tested / Cultures homologues testées / Getestete homologe Kulturen / Culture 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	Madelaia
1,5	Thompson var. berlin		

AVAILABILITY / CONDITIONNEMENT / LIEFERBARE PRODUKTE / DISPONIBILITÀ / DISPONIBILIDAD

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



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant / Proizvođač / Gyártó / Fabbicante / Атқарушы / Gamintojas / Ražotājs / Tilvirker / Producent / Producător / Производитель / Výrobca / Proizvođač / Tillverkare / Üretici / Виробник



Use by / Используйте до / Spotřebujte do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de péremption / Upotrijebiti do / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Дейін пайдалануға / Naudokite iki / Izlietot līdz / Houdbaar tot / Brukes for / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Использовать до / Použite do / Upotrebiti do / Använd före / Son kullanna tarihi / Використати до/line
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
 ЖЖЮК-АА-КК / ЖЖЮК-АА / (АА = айдың соңы)
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)
 GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mēneša beigas)
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutten av måneden)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiac)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutet av månaden)
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)
 PPPP-MM-DD / PPPP-MM (MM = кінець місяця)



Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo / Katalooginumber / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalógusszám / Numero di catalogo / Каталог номер / Katalogo numeris / Kataloga numurs / Catalogus nummer / Numer katalogowy / Număr de catalog / Номер по каталогу / Katalógové číslo / Kataloški broj / Katalog numarası / Номер за каталогом



Authorized Representative in the European Community / Оторизиран представител в Европейската общност / Autorizovaný zástupce pro Evropském společenství / Autoriseret repræsentant i De Europæiske Fællesskaber / Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Représentant autorisé pour la Communauté européenne / Autorizirani predstavnik u Europskoj uniji / Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā / Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo we Wspólnocie Europejskiej / Representante autorizado na Comunidade Europeia / Reprezentantul autorizat pentru Comunitatea Europeană / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Autorizovano predstavništvo u Evropskoj uniji / Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Уповноважений представник у країнах ЄС



In Vitro Diagnostic Medical Device / Медицински уред за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In vitro diagnostika meditsiniaparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жасанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / In vitro diagnostikos prietaisas / Medicīnas ierīces, ko lieto in vitro diagnostikā / Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Medicinska romôcka na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Diyagnostik Tibbi Cihaz / Медичний пристрій для діагностики in vitro



Temperature limitation / Температурни ограничения / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturbegrenzung / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperatuuri piirang / Limites de température / Dozvoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температураны шектеу / Laikymo temperatūra / Temperaturas ierobežojumi / Temperatuurlimiet / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatură / Ограничение температуры / Ograničenje teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgräns / Sıcaklık sınırlaması / Обмеження температури



Batch Code (Lot) / Код на партидата / Kód (číslo) šarže / Batch-kode (lot) / Batch-Code (Charge) / Κωδικός παρτίδας (παρτίδα) / Código de lote (lote) / Partii kood / Numéro de lot / Lot (kod) / Tétel száma (Lot) / Codice batch (lotto) / Топтама коды / Partijos numeris (LOT) / Partijas kods (laidiens) / Lot nummer / Batch-kode (parti) / Kod partii (seria) / Código do lote / Cod de serie (Lot) / Код партии (лот) / Kód série (šarža) / Kod serije / Partinummer (Lot) / Parti Kodu (Lot) / Код партії



Contains sufficient for <n> tests / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Dostatečné množství pro <n> testů / Ineholder tilstrækkeligt til <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις / Contenido suficiente para <n> pruebas / Küllaldane <n> testide jaoks / Contenu suffisant pour <n> tests / Sadržaj za <n> testova / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / <n> тесттері үшін жеткілікті / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Satur pietiekami <n> pārbaudēm / Inhoud voldoende voor "n" testen / Inholder tilstrekkelig til <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Conteúdo suficiente para <n> testes / Conținut suficient pentru <n> teste / Достаточное для <n> тестов(a) / Obsah vystačí na <n> testov / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Innehåller tillräckligt för <n> analyser / <n> test için yeterli malmeme içerir / Вистачить для аналізів: <n>



Consult Instructions for Use / Направете справка в инструкциите за употреба / Prostudujte pokyny k použití / Se brugsanvisningen / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultar las instrucciones de uso / Lugeda kasutusjuhendit / Consulter la notice d'emploi / Koristi upute za upotrebu / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Skatīt lietošanas pamācību / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consultar as instruções de utilização / Consultați instrucțiunile de utilizare / См. руководство по эксплуатации / Pozri Pokyny na používanie / Pogleđajte uputstvo za upotrebu / Se bruksanvisningen / Kullanım Talimatları'na başvurun / Див. інструкції з використання



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA

Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland