

## ANTISIERI PER TIPIZZAZIONE DELLE SALMONELLE

### IMPIEGO PREVISTO

Gli antisieri PRO-LAB Vision sono preparazioni da usare per l'identificazione sierologica di organismi appartenenti al genere *Salmonella* in base alla classificazione di Kauffmann- White (4).

### INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

Il genere *Salmonella* contiene un'ampia varietà di specie patogene che colpiscono uomo e animali in tutto il mondo. Per l'identificazione completa di *Salmonella* è necessario isolare la coltura, eseguire una caratterizzazione biochimica ed un'identificazione sierologica (sierotipizzazione).

Gli antisieri (somatici) O polivalenti PRO-LAB sono previsti per facilitare il gruppaggio sierologico iniziale. L'identificazione completa degli antigeni O può essere attuata utilizzando antisieri O monovalenti specifici (1). Il sierotipo dei ceppi di *Salmonella* è determinabile mediante l'uso di antisieri H (flagellari) monovalenti e polivalenti (1,2).

Il principio dell'identificazione sierologica di *Salmonella* prevede la miscelazione dell'organismo sospetto con antisieri contenenti anticorpi anti-*Salmonella* specifici. In presenza di un antisiero omologo i batteri agglutinano (aggregazione).

Lo schema d'identificazione più comune è il seguente:

1 - Testare le colonie con antisiero polivalente somatico O (A-S), cat. n°17PL6002

se il risultato è positivo la colonia è identificata come *Salmonella*.

2 - Conferma: testare le colonie con antisero polivalente flagellare H (poli H fasi 1 e 2) cat. n°17PL6100

(deve essere sempre positivo se il primo è risultato positivo).

3 - Testare le colonie con antisero polivalente flagellare H (fase 2 fattori 1,2,5,6, z6) cat. n°17PL6101: se il risultato è positivo la colonia è identificata come *Salmonella* in fase 2, se il risultato è negativo la colonia è identificata come *Salmonella* in fase 1.

4 - Continuare con la sierotipizzazione con antisieri monovalenti somatici e flagellari

Se si sospetta la presenza di *Salmonella typhi* la colonia deve essere testata con :

- polivalente O (A-S) cat. n° 17PL6002
- monovalente O gruppo D, fattore 9 cat. n°17PL6015
- monovalente O gruppo B/D, fattore 12 - cat. n° 17PL6016
- Vi cat. n°17PL6040
- monovalente H, fattore d - cat. n° 17PL6113

Tutti gli antisieri testati devono dare risultato positivo per identificare la colonia come *S.typhi*.

*S. paratyphi* presenta le seguenti formule antigeniche:

*S.paratyphi* A: antigeni somatici: 1, 2, 12  
antigene flagellare: a  
Vi assente

*S.paratyphi* B: antigeni somatici: 1, 4, 5, 12  
antigene flagellare: b  
fase 2: (1,2)  
Vi assente

*S.paratyphi* C: antigeni somatici: 6, 7  
antigene flagellare: c  
fase 2: (1, 5)  
Vi: presente

La sierotipizzazione di *S.paratyphi* A 1, 2, 12, a, richiede i seguenti antisieri

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| cat. n° 17PL6002 - poli A-S          | positivo |
| cat. n° 17PL6100 - poli H fase 1 + 2 | positivo |
| cat. n° 17PL6101 - poli H fase 2     | negativo |
| cat. n° 17PL6016 - mono O 12         | positivo |
| cat. n° 17PL6110 - mono H, a         | positivo |
| cat. n° 17PL6040 - Vi                | negativo |

La sierotipizzazione di *S.paratyphi* B 1, 4, 5, 12 b, richiede i seguenti antisieri

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| cat. n° 17PL6002 - poli A-S          | positivo                                     |
| cat. n° 17PL6100 - poli H fase 1 + 2 | positivo                                     |
| cat. n° 17PL6101 - poli H fase 2     | positivo se in fase 2, negativo se in fase 1 |
| cat. n° 17PL6011 - mono O 4          | positivo                                     |
| cat. n° 17PL6012 - mono O 5          | positivo                                     |
| cat. n° 17PL6016 - mono O 12         | positivo                                     |
| cat. n° 17PL6111 - mono H b          | positivo                                     |
| cat. n° 17PL6040 - Vi                | negativo                                     |
| cat. n° 17PL6153 - mono H, 2         | positivo per la fase 2                       |

La sierotipizzazione di *S.paratyphi* C 6, 7 c, richiede i seguenti antisieri

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| cat. n° 17PL6002 - poli A-S          | positivo   |
| cat. n° 17PL6100 - poli H fase 1 + 2 | positivo   |
| cat. n° 17PL6101 - poli H fase 2     | positivo se già in fase 2, negativo se in fase 1 |
| cat. n° 17PL6013 - mono O 6,7        | positivo   |
| cat. n° 17PL6112 - mono H c          | positivo   |
| cat. n° 17PL6040 - Vi                | positivo   |
| cat. n° 17PL6154 - mono H, 5         | positivo per la fase 2                           |

### REAGENTI

Gli antisieri monovalenti e polivalenti O e H per Salmonella PRO-LAB sono preparati in conigli con l'impiego di ceppi di riferimento in base ai metodi consigliati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (3,4) ed assorbiti per eliminare gli anticorpi cross-reagenti. Gli antisieri PRO-LAB sono forniti in un flacone con contagocce contenente 3.0 ml di antisieri diluiti pronti all'uso con 0.01% di thimerosal come conservante.

### PRECAUZIONI

1. Non usare gli antisieri oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
2. Gli antisieri contengono thimerosal, un composto a base di mercurio altamente tossico. Sebbene la quantità di thimerosal nell'antisiero sia minima, occorre adottare precauzioni di sicurezza durante la manipolazione, il trattamento e lo smaltimento del reagente.
3. Evitare la contaminazione del flacone di reagente.
4. Il campione da testare può contenere organismi patogeni per l'uomo e pertanto deve essere manipolato e smaltito come materiale infettivo.
5. Il reagente è destinato esclusivamente ad uso diagnostico *in vitro*.
6. Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.

### MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

- Vetrini o provette.
- Salina normale (soluzione di cloruro di sodio 0,85%).
- Anse usa e getta o metalliche.
- Bagnomaria impostato a 51°C.

### CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Gli antisieri per Salmonella devono essere conservati a 2-8°C. Non congelare. Se conservati alle condizioni appena descritte, gli antisieri possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

### RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DELLE COLTURE

Per le procedure specifiche di raccolta e preparazione delle colture primarie, fare riferimento ad un manuale di normali tecniche microbiologiche. Le colonie isolate su terreno agarizzato enterico differenziale e con sospetto di Salmonella devono essere confermate con i test biochimici tradizionali. In generale, i terreni a selettività bassa o quelli a selettività media dovrebbero essere utilizzati per coltivare colonie previste per l'identificazione dell'antigene somatico O. Per l'identificazione dell'antigene flagellare H, la fase liquida della crescita è il momento migliore per la preparazione della coltura.

### PROTOCOLLO

#### **A. Identificazione dell'antigene Vi e di quello somatico di Salmonella (test su vetrino)**

1. Mettere due gocce separate di soluzione salina normale (cloruro di sodio 0,85%) su un vetrino pulito.
2. Prelevare una colonia sospetta da una piastra di coltura overnight e miscelare bene con le due gocce di soluzione salina normale sul vetrino fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Aggiungere una goccia di antisiero ad una delle gocce di sospensione batterica sul vetrino, all'altra (controllo) aggiungere una goccia di soluzione salina normale.
4. Miscelare l'antisiero con la sospensione batterica utilizzando un'ansa sterile.
5. Inclinare delicatamente in avanti e all'indietro il vetrino per un minuto ed osservare l'agglutinazione in condizioni di luce normali, preferibilmente con l'impiego di un obiettivo a bassa risoluzione.

#### **B. Identificazione dell'antigene flagellare (H) di Salmonella (test su vetrino):**

La procedura è la stessa prevista per l'identificazione dell'antigene somatico ad eccezione dell'utilizzo della coltura in fase liquida da un terreno semi-solido con una provetta Craigie (1) o della coltura nel liquido di un agar a becco di clarino. Se si utilizza una brodocoltura non è necessario preparare sospensioni saline. Normalmente l'individuazione dell'antigene flagellare è realizzabile mediante test d'agglutinazione su vetrino; tuttavia, alcuni ceppi sono scarsamente flagellati e possono essere identificati solo mediante test di agglutinazione in provetta.

#### **C. Identificazione degli antigeni somatici, Vi ed H di Salmonella (test in provetta):**

1. Preparazione di sospensioni cellulari per l'esecuzione dei test: per l'identificazione degli antigeni somatici, preparare una sospensione densa di batteri in soluzione salina normale e bollire per 10 minuti o usare cellule alcool-disidratate e risospese in soluzione salina normale in provetta Brown 2. Preparare una brodocoltura con formalina per l'identificazione dell'antigene 'H'. Per l'identificazione degli antigeni 'Vi', sospendere le colonie 'Vi' sospette in 0.5% di formalina nella provetta Brown 2.
2. Diluizione antisieri: per utilizzare gli antisieri Salmonella PRO-LAB in provetta, prima dell'uso diluire 1:5 ogni antisiero con soluzione salina normale.
3. Aggiungere 150 ul di salina normale ad una provetta di vetro e in un'altra provetta aggiungere un volume uguale di antisieri diluiti.
4. Aggiungere ad ogni provetta un volume uguale di sospensione cellulare precedentemente preparata.
5. Incubare a bagnomaria a 51°C per 2 ore in caso di identificazione di antigeni flagellari o per 5 - 18 ore in caso di identificazione somatica o 'Vi'.
6. Osservare le provette per controllare l'agglutinazione.

#### **D. Identificazione dell'antigene (H) flagellare della Salmonella con l'impiego dei sieri per la diagnosi veloce della Salmonella:**

Per determinare il gruppo flagellare è previsto l'uso combinato dei sieri per la diagnosi veloce di *Salmonella*.

1. Per la procedura riguardante l'identificazione dell'antigene (H) flagellare di *Salmonella* con il test su vetrino fare riferimento alla procedura B.
2. Per la procedura riguardante l'identificazione dell'antigene (H) flagellare di *Salmonella* con il test in provetta fare riferimento alla procedura C.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Per la procedura A o B:  
Un'agglutinazione evidente (aggregato granulare) entro 60 secondi, senza alcuna agglutinazione nella soluzione salina di controllo (auto-agglutinazione) è considerata un risultato positivo. I risultati positivi possono essere confermati da test di agglutinazione in provetta.
2. Per la procedura C:  
Gli "aggregati" granulari osservati nella provetta vengono considerati un risultato positivo per l'identificazione dell'antigene 'O', mentre un aspetto flocculare più marcato, osservato con l'utilizzo di una luce chiara contro uno sfondo scuro, è considerato un risultato positivo per l'identificazione dell'antigene 'H'.
3. Per la procedura D:
  - (i) Per il test su vetrino, si procede all'interpretazione dei risultati positivi come da quanto indicato in 1.
  - (ii) Per il test in provetta si procede all'interpretazione dei risultati positivi come da quanto indicato in 2.

(iii) Per l'interpretazione dei risultati dei sieri per la diagnosi veloce della *Salmonella* 1, 2 e 3 come panel testing, fare riferimento alla tabella che segue:

### Gruppo flagellare *Salmonella*

|   | Sieri | b | d | e | G | k | L | r |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|
| Sieri per la diagnosi veloce di <i>Salmonella</i> 1 |       | + | + | + | - | - | - | + |
| Sieri per la diagnosi veloce di <i>Salmonella</i> 2 |       | + | - | + | - | + | + | - |
| Sieri per la diagnosi veloce di <i>Salmonella</i> 3 |       | - | + | + | + | + | - | - |

### LIMITI DEL METODO

1. Gli antisieri devono essere utilizzati esclusivamente per l'identificazione di colture precedentemente caratterizzate come *Salmonelle* con test biochimici. La presenza d'antigeni simili sulla superficie di batteri diversi dalle *Salmonelle* può dare luogo a risultati falsi.
2. I ceppi rugosi agglutinano producendo risultati falso positivi. Pertanto ogni test dovrebbe includere un controllo con salina normale per garantire la specificità della reazione.
3. Si consiglia di controllare la funzionalità degli antisieri per *Salmonella* con colture stock di struttura antigenica nota.

### BIBLIOGRAFIA

1. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th Ed. Eisevier Science Publishing Co., New York.
2. Spicer, C.C. 1956. J. Clin. Path. 9: 378.
3. World Health Organization, Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Antigenic formulae of the salmonella serovars 1992. WHO International Salmonella Centre, Institut Pasteur, Paris.
4. Kauffmann, F. 1966. The Bacteriology of *Enterobacteriaceae*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

\*Per i reagenti disponibili consultare elenco sul retro

### REAGENTI DISPONIBILI

#### Antisieri O somatici polivalenti:

|          |                                  |
|----------|----------------------------------|
| 17PL6000 | Polivalente O A - I + Vi         |
| 17PL6002 | Polivalente O A - S              |
| 17PL6003 | Polivalente A = B, D, E          |
| 17PL6004 | Polivalente B = C1, C2, F, G, H. |
| 17PL6005 | Polivalente C = I - O            |
| 17PL6006 | Polivalente D = P - S            |

#### Antisieri O somatici monovalenti:

|          |                                 |
|----------|---------------------------------|
| 17PL6010 | Gruppo A, Fattore 2             |
| 17PL6011 | Gruppo B, Fattore 4             |
| 17PL6012 | Gruppo B, Fattore 5             |
| 17PL6013 | Gruppo C, Fattore 6,7           |
| 17PL6014 | Gruppo C2, Fattore 8            |
| 17PL6015 | Gruppo D, Fattore 9             |
| 17PL6016 | Gruppo B/D, Fattore 12          |
| 17PL6017 | Gruppo E, Fattore 3,10,15,19,34 |
| 17PL6018 | Gruppo E1, Fattore 10           |
| 17PL6019 | Gruppo E2, Fattore 15           |
| 17PL6020 | Gruppo E4, Fattore 19           |
| 17PL6021 | Gruppo E3, Fattore 34           |
| 17PL6022 | Gruppo F, Fattore 11            |
| 17PL6023 | Gruppo G, Fattore 13,22,23      |
| 17PL6024 | Gruppo G1, Fattore 22           |
| 17PL6025 | Gruppo G2, Fattore 23           |
| 17PL6027 | Gruppo C3, Fattore 20           |
| 17PL6028 | Gruppo H2, Fattore 25           |
| 17PL6029 | Gruppo I, Fattore 16            |
| 17PL6030 | Gruppo J, Fattore 17            |
| 17PL6031 | Gruppo K, Fattore 18            |
| 17PL6032 | Gruppo L, Fattore 21            |
| 17PL6033 | Gruppo M, Fattore 28            |
| 17PL6034 | Gruppo N, Fattore 30            |
| 17PL6035 | Gruppo O, Fattore 35            |
| 17PL6036 | Gruppo P, Fattore 38            |
| 17PL6037 | Gruppo Q, Fattore 39            |

|          |                      |
|----------|----------------------|
| 17PL6038 | Gruppo R, Fattore 40 |
| 17PL6039 | Gruppo S, Fattore 41 |
| 17PL6040 | Vi                   |
| 17PL6041 | Fattore 55           |

**Antisieri H flagellari polivalenti:**

|          |   |
|----------|---|
| 17PL6100 | H Polivalente   |
| 17PL6101 | Fase 2 H Polivalente, Fattori 1,2,5,6,7,z6                                    |
| 17PL6102 | Fattori A polivalenti, a,b,c,d,i,z10,z29                                      |
| 17PL6103 | PolivalenteB Fattori,e,f,g,h,m,n,p,q,s,t,u,x,z15,z51                          |
| 17PL6104 | Fattori C polivalenti, k,l,r,v,w,y,z,z4,z13,z23,z24,z28,z32,z40,<br>1,2,5,6,7 |

**Antisieri H flagellari monovalenti:**

|          |                            |
|----------|----------------------------|
| 17PL6110 | Fattore a                  |
| 17PL6111 | Fattore b                  |
| 17PL6112 | Fattore c                  |
| 17PL6113 | Fattore d                  |
| 17PL6114 | Complesso E eh, enx, enz15 |
| 17PL6115 | Fattore eh                 |
| 17PL6116 | Fattore enx                |
| 17PL6117 | Fattore enz15              |
| 17PL6118 | Fattore h                  |
| 17PL6120 | Fattore z15                |
| 17PL6121 | Complesso G                |
| 17PL6122 | Fattore gm                 |
| 17PL6123 | Fattore gp                 |
| 17PL6124 | Fattore p                  |
| 17PL6125 | Fattore u                  |
| 17PL6126 | Fattore s                  |
| 17PL6127 | Fattore m                  |
| 17PL6128 | Fattore t                  |
| 17PL6129 | Fattore f                  |
| 17PL6131 | Fattore q                  |
| 17PL6132 | Fattore z51                |
| 17PL6133 | Fattore i                  |
| 17PL6134 | Fattore k                  |
| 17PL6135 | Complesso L                |
| 17PL6136 | Fattori l, w               |
| 17PL6137 | Fattori l,v                |
| 17PL6138 | Fattore w                  |
| 17PL6139 | Fattore v                  |
| 17PL6140 | Fattore z13                |
| 17PL6141 | Fattore z28                |
| 17PL6142 | Fattore r                  |
| 17PL6143 | Fattore y                  |
| 17PL6144 | Fattore z                  |
| 17PL6145 | Z4 Complesso               |
| 17PL6146 | Fattore z23                |
| 17PL6147 | Fattore z24                |
| 17PL6148 | Fattore z32                |
| 17PL6149 | Fattore z10                |
| 17PL6151 | Fattore z29                |
| 17PL6153 | Fattore 2                  |
| 17PL6154 | Fattore 5                  |
| 17PL6155 | Fattore 6                  |
| 17PL6156 | Fattore 7                  |
| 17PL6157 | Fattore z6                 |

**Sieri per la diagnosi veloce di Salmonella:**

|          |  |
|----------|--|
| 17PL6200 | Sieri per la diagnosi veloce di Salmonella 1 |
| 17PL6201 | Sieri per la diagnosi veloce di Salmonella 2 |
| 17PL6202 | Sieri per la diagnosi veloce di Salmonella 3 |

Revisione Prolab: 12/2002

