

## 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), l'utilizzo è riservato a personale adeguatamente qualificato.

## 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 della *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 della *Salmonella* prevede la miscelazione dell'organismo sospetto con antisieri contenenti anticorpi *Salmonella* specifici. In presenza di un antisiero omologo i batteri agglutinano (aggregazione).

## 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 gocciolatore contenente 3.0 ml di antisieri diluiti pronti all'uso con 0.01% di thimerosal come conservante.

## PRECAUZIONI

- Non usare gli antisieri oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
- 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.
- Evitare la contaminazione del flacone di reagente.
- Il campione da testare può contenere organismi patogeni per l'uomo e pertanto deve essere manipolato e smaltito come materiale infettivo.
- Il reagente è destinato esclusivamente ad uso diagnostico *in vitro*.
- Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.
- Il prodotto contiene materiale di origine animale e deve essere manipolato come potenziale portatore e trasmettitore di malattie.

## MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

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

## STABILITÀ E CONSERVAZIONE

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, ad es. agar sangue o agar nutriente, 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.

## PROCEDURA

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

- Mettere due anse piene separate di salina normale (cloruro di sodio 0,85%) su un vetrino pulito.
- Prelevare una piccola parte di una colonia sospetta da una piastra di coltura notturna e miscelare bene con le due gocce di salina normale sul vetrino fino ad ottenere una sospensione omogenea.
- Aggiungere un'ansa piena di antisiero ad una delle gocce di sospensione batterica sul vetrino, all'altra (controllo) aggiungere un'ansa piena di salina normale.
- Miscelare l'antisiero con la sospensione batterica utilizzando un'ansa sterile.
- Inclinare delicatamente in avanti e all'indietro il vetrino per un minuto ed osservare l'agglutinazione in condizioni di luce normale, preferibilmente con l'impiego di un obiettivo a bassa potenza.

### B. Identificazione dell'antigene flagellare (H) della *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 semisolido con una provetta Craigie (1) o della coltura nel liquido di un agar in pendenza. 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 della *Salmonella* (test in provetta):

- 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 formolata 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.
- Diluizione antisieri: Per utilizzare gli antisieri *Salmonella* PRO-LAB in

provetta, prima dell'uso diluire 1:5 ogni antisiero con 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 della *Salmonella*.

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

- Per il test su vetrino, si procede all'interpretazione dei risultati positivi come da quanto indicato in 1.
- Per il test in provetta si procede all'interpretazione dei risultati positivi come da quanto indicato in 2.
- 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:

Sieri	Gruppo flagellare <i>Salmonella</i>					
	b	d	E	G	k	L r
Sieri per la diagnosi veloce della <i>Salmonella</i> 1	+	+	+	-	-	+
Sieri per la diagnosi veloce della <i>Salmonella</i> 2	+	-	+	-	+	+
Sieri per la diagnosi veloce della <i>Salmonella</i> 3	-	+	+	+	+	-

## LIMITI DELLE PROCEDURE

- 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* non è stata testata e può dare luogo a risultati falsi.



- I ceppi rugosi agglutinano producendo risultati falso positivi. Pertanto ogni test dovrebbe includere un controllo con salina normale per garantire la specificità della reazione.
- Si consiglia di controllare la potenza degli antisieri per *Salmonella* con colture stock di struttura antigenica nota.
- Sebbene la maggior parte dei ceppi di salmonella in possesso degli antigeni adeguati agglutinino in presenza di un antisiero omologo, a causa di lievi differenze, ad esempio, dell'espressione antigenica tra ceppi dello stesso sierotipo e di ciascuna colonia dovute a variazioni di forma (rif. 5), l'agglutinazione non può essere sempre garantita.
- L'utilizzo di volumi superiori a 10 µl può ridurre la sensibilità del test su vetrino.

#### BIBLIOGRAFIA

- Ewing, W.H.** 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th Ed. Elsevier Science Publishing Co., New York.
- Spicer, C.C.** 1956. J. Clin. Path. 9:378.
- World Health Organization, Centre for Reference and Research on Salmonella.** Antigenic formulae of the *salmonella* serovars 1992. WHO International Salmonella Centre, Institut Pasteur, Paris.
- Kauffmann, F.** 2001. The Bacteriology of Enterobacteriaceae. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bergan T.** (Ed). 1984. Methods in Microbiology. Vol. 15. Serology of *Salmonella*. Lindberg A, Minor L. 1-141.

#### REAGENTI DISPONIBILI

##### Antisieri O somatici polivalenti:

PL.6000 Polivalente O A - I + Vi  
 PL.6002 Polivalente O A - S

##### Antisieri O somatici monoivalenti:

PL.6010 Gruppo A, Fattore 2  
 PL.6011 Gruppo B, Fattore 4  
 PL.6012 Gruppo B, Fattore 5  
 PL.6013 Gruppo C, Fattore 6,7  
 PL.6014 Gruppo C2, Fattore 8  
 PL.6015 Gruppo D, Fattore 9  
 PL.6016 Gruppo B/D, Fattore 12  
 PL.6017 Gruppo E, Fattore 3,10,15,19,34  
 PL.6018 Gruppo E1, Fattore 10  
 PL.6019 Gruppo E2, Fattore 15  
 PL.6020 Gruppo E4, Fattore 19  
 PL.6021 Gruppo E3, Fattore 34  
 PL.6022 Gruppo F, Fattore 11  
 PL.6023 Gruppo G, Fattore 13,22,23  
 PL.6024 Gruppo G1, Fattore 22  
 PL.6025 Gruppo G2, Fattore 23  
 PL.6027 Gruppo C3, Fattore 20  
 PL.6029 Gruppo I, Fattore 16  
 PL.6030 Gruppo J, Fattore 17  
 PL.6031 Gruppo K, Fattore 18  
 PL.6032 Gruppo L, Fattore 21  
 PL.6033 Gruppo M, Fattore 28  
 PL.6034 Gruppo N, Fattore 30  
 PL.6035 Gruppo O, Fattore 35  
 PL.6036 Gruppo P, Fattore 38  
 PL.6037 Gruppo Q, Fattore 39  
 PL.6038 Gruppo R, Fattore 40  
 PL.6039 Gruppo S, Fattore 41  
 PL.6040 Vi  
 PL.6041 Factor 55

##### Antisieri H flagellari polivalenti:

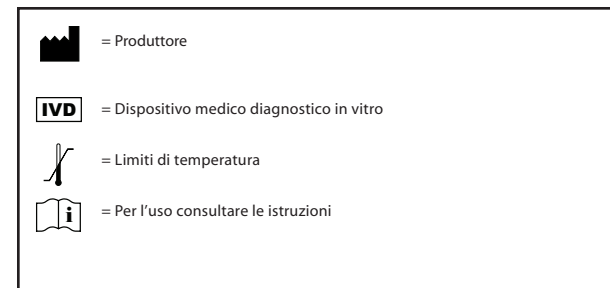
PL.6100 H Polivalente  
 PL.6101 Fase 2 H Polivalente, Fattori 1,2,5,6,7,z6

##### Antisieri H flagellari monoivalenti:

PL.6110 Fattore a  
 PL.6111 Fattore b  
 PL.6112 Fattore c  
 PL.6113 Fattore d  
 PL.6114 Complesso E eh, enx, enz15  
 PL.6115 Fattore eh  
 PL.6116 Fattore enx  
 PL.6117 Fattore enz15  
 PL.6118 Fattore h  
 PL.6120 Fattore z15  
 PL.6121 Complesso G  
 PL.6122 Fattore gm  
 PL.6123 Fattore gp  
 PL.6124 Fattore p  
 PL.6125 Fattore u  
 PL.6126 Fattore s  
 PL.6127 Fattore m  
 PL.6128 Fattore t  
 PL.6129 Fattore f  
 PL.6131 Fattore q  
 PL.6133 Fattore i  
 PL.6134 Fattore k  
 PL.6135 Complesso L  
 PL.6136 Fattori l, w  
 PL.6137 Fattori l, v  
 PL.6138 Fattore w  
 PL.6139 Fattore v  
 PL.6140 Fattore z13  
 PL.6141 Fattore z28  
 PL.6142 Fattore r  
 PL.6143 Fattore y  
 PL.6144 Fattore z28  
 PL.6145 Z4 Complesso  
 PL.6146 Fattore z28  
 PL.6147 Fattore z28  
 PL.6148 Fattore z28  
 PL.6149 Fattore z28  
 PL.6151 Fattore z28  
 PL.6153 Fattore 2  
 PL.6154 Fattore 5  
 PL.6155 Fattore 6  
 PL.6156 Fattore 7  
 PL.6157 Fattore z28

##### Sieri per la diagnosi veloce della *Salmonella*:

PL.6200 Sieri per la diagnosi veloce della *Salmonella* 1  
 PL.6201 Sieri per la diagnosi veloce della *Salmonella* 2  
 PL.6202 Sieri per la diagnosi veloce della *Salmonella* 3



**Le presenti istruzioni per l'uso sono state accuratamente tradotte dalla versione originale in lingua inglese. In caso di ambiguità o apparente discrepanza rivolgersi al servizio assistenza Pro-Lab.**