

## APLICACIÓN

El suero aglutinante de salmonella, que solo el personal debidamente cualificado debe utilizar, está diseñado para identificar de forma serológica organismos pertenecientes al género *Salmonella* según la clasificación de Kauffmann-White.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El género *Salmonella* contiene una gran variedad de especies patógenas que afectan a los humanos y animales en todo el mundo. La identificación completa de *Salmonella* requiere el aislamiento en cultivo, la caracterización bioquímica y la identificación serológica (serotipado). El suero polivalente aglutinante O (somático) de *Salmonella* está destinado a ayudar a la seroagrupación inicial. La identificación completa de los antígenos O se puede lograr con antisueros O monovalentes. El serotipo de los cultivos de salmonella puede determinarse mediante el uso de antisueros H (flagelares) polivalentes y monovalentes.

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio de la identificación serológica de la salmonella implica mezclar el organismo del que se tiene sospecha con el suero aglutinante que contiene ciertos anticuerpos de salmonella. Las bacterias se aglutinarán (aglutinación) con la presencia de sueros homólogos.

## MATERIALES SUMINISTRADOS

El suero aglutinante monovalente y polivalente O y H de salmonella de Pro-Lab Diagnostics se prepara en conejos mediante cepas de referencia de conformidad con los métodos recomendados por Organización Mundial de la Salud (OMS) y se absorbe para eliminar los anticuerpos de reacción cruzada.

El suero aglutinante de salmonella viene en frascos cuentagotas que contienen 3 ml de suero aglutinante diluido listo para usar con azida de sodio o tiomersal como conservante.

### Antisueros O polivalentes (somáticos)

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

### Antisueros O monovalentes (somáticos)

- PL.6010 Grupo A, Factor 2
- PL.6011 Grupo B, Factor 4
- PL.6012 Grupo B, Factor 5
- PL.6013 Grupo C, Factor 6,7
- PL.6014 Grupo C2, Factor 8
- PL.6015 Grupo D, Factor 9
- PL.6016 Grupo B/D, Factor 12
- PL.6017 Grupo E, Factor 3,10,15,19,34
- PL.6018 Grupo E1, Factor 10
- PL.6019 Grupo E2, Factor 15
- PL.6020 Grupo E4, Factor 19
- PL.6021 Grupo E3, Factor 34
- PL.6022 Grupo F, Factor 11
- PL.6023 Grupo G, Factor 13,22,23
- PL.6024 Grupo G1, Factor 22
- PL.6025 Grupo G2, Factor 23
- PL.6027 Grupo C3, Factor 20
- PL.6029 Grupo I, Factor 16
- PL.6030 Grupo J, Factor 17
- PL.6031 Grupo K, Factor 18
- PL.6032 Grupo L, Factor 21

- PL.6033 Grupo M, Factor 28
- PL.6034 Grupo N, Factor 30
- PL.6035 Grupo O, Factor 35
- PL.6036 Grupo P, Factor 38
- PL.6037 Grupo Q, Factor 39
- PL.6038 Grupo R, Factor 40
- PL.6039 Grupo S, Factor 41
- PL.6040 Vi
- PL.6041 Factor 55

### Antisueros H polivalentes (flagelares)

- PL.6100 Polivalente H
- PL.6101 Polivalente H Fase 2, Factores 1,2,5,6,7,6

### Antisueros H monovalentes (flagelares)

- PL.6110 Factor a
- PL.6111 Factor b
- PL.6112 Factor c
- PL.6113 Factor d
- PL.6114 E Complejo eh, enx, enz15
- PL.6115 Factor eh
- PL.6116 Factor enx
- PL.6117 Factor enz15
- PL.6118 Factor h
- PL.6120 Factor z15
- PL.6121 Complejo G
- PL.6122 Factor gm
- PL.6123 Factor gp
- PL.6124 Factor p
- PL.6125 Factor u
- PL.6126 Factor s
- PL.6127 Factor m
- PL.6128 Factor t
- PL.6129 Factor f
- PL.6131 Factor q
- PL.6133 Factor i
- PL.6134 Factor k
- PL.6135 Complejo L
- PL.6136 Factores l, w
- PL.6137 Factores l, v
- PL.6138 Factor w
- PL.6139 Factor v
- PL.6140 Factor z13
- PL.6141 Factor z28
- PL.6142 Factor r
- PL.6143 Factor y
- PL.6144 Factor z
- PL.6145 Z4 Complejo
- PL.6146 Factor z23
- PL.6147 Factor z24
- PL.6148 Factor z32
- PL.6149 Factor z10

- PL.6151 Factor z29
- PL.6153 Factor 2
- PL.6154 Factor 5
- PL.6155 Factor 6
- PL.6156 Factor 7
- PL.6157 Factor z6

### Sueros rápidos de diagnóstico de salmonella:

- PL.6200 Suero rápido de diagnóstico de salmonella 1
- PL.6201 Suero rápido de diagnóstico de salmonella 2
- PL.6202 Suero rápido de diagnóstico de salmonella 3

### MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Portaobjetos de vidrio o tubos de ensayo
- Solución salina normal (0,85 % solución NaCl)
- Asa de recogida de muestras
- Baño maría a 50 °C

### ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

El suero aglutinante de salmonella debe almacenarse a temperaturas de entre 2 y 8 °C. No congelar. Si se almacena en estas condiciones, el suero aglutinante permanece activo hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del frasco. Durante el almacenamiento el suero aglutinante puede adquirir un ligero aspecto turbio, que no indica necesariamente su deterioro. Antes del uso, clarifique el suero mediante centrifugación o filtración. Un aspecto demasiado turbio es señal de contaminación y el suero se debe desechar. Deje que el suero alcance una temperatura ambiente antes de usarlo.

### PRECAUCIONES

- No usar el suero aglutinante después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.
- El suero con un número de lote numérico de 4 dígitos precedido por la letra P contiene azida de sodio, un sustancia que es muy tóxica. Aunque el suero tiene una cantidad mínima de azida de sodio, se deben tomar precauciones de seguridad al manipular, procesar y desechar el reactivo.
- El suero con un número de lote numérico de 4 dígitos contiene tiomersal, un compuesto a base de mercurio altamente tóxico presente en una concentración de 0.01%. Aunque el suero tiene una cantidad mínima, se deben tomar precauciones de seguridad al manipular, procesar y desechar el reactivo.
- Evitar la contaminación del frasco del reactivo.
- La muestra puede contener organismos patógenos para el ser humano y debe manipularse y desecharse como material infeccioso.
- El reactivo está pensando solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Los procedimientos, condiciones de almacenamiento, precauciones y limitaciones especificados en estas instrucciones deben respetarse para que las pruebas tengan resultados válidos.
- El producto contiene sustancias de origen animal y debe manipularse como un potencial portador y transmisor de enfermedades.
- El antígeno Vi puede enmascarar la identidad de los antígenos O. En este caso, puede ser necesario calentar una suspensión de antígeno del aislado durante una hora a 100 °C o durante 15 minutos a 120 °C.
- Cualquier incidente grave que se presente en relación con el producto se debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que se haya producido el suceso.

## CONSERVACIÓN Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Para conocer los procedimientos específicos relativos a la recogida de muestras y la preparación de cultivos primarios, consulte un manual de microbiología. Las colonias aisladas en placas de agar diferencial entérico y sospechosas de ser salmonella deben confirmarse con pruebas bioquímicas convencionales. En general, deben utilizarse medios de baja selectividad, tales como agar-sangre o agar-nutriente, para cultivar colonias para identificar el antígeno somático «O». Para identificar el antígeno flagelar «H», lo mejor es preparar el cultivo a partir de un crecimiento en fase líquida.

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

### A. Identificación del antígeno somático y Vi de salmonella (prueba en portaobjetos):

- Dispense dos gotas separadas de solución salina (0,85 % de cloruro de sodio) en un portaobjetos de vidrio limpio.
- Emulsione una pequeña parte de la colonia de salmonella del cultivo en placa en cada una de las gotas de solución salina. Mezcle bien para obtener una suspensión bacteriana homogénea. Deseche el portaobjetos y repita la operación si se produce autoaglutinación (aglutinación).
- Añada una gota de suero a una de las gotas de suspensión bacteriana. Añada una gota de solución salina a la otra; esto servirá de control.
- Mezcle el suero aglutinante con la suspensión bacteriana con un asa estéril.
- Incline suavemente el portaobjetos hacia delante y hacia atrás durante un minuto. En condiciones normales de iluminación, observe si se aglutina la suspensión con el suero y si se aclara la suspensión salina.

### B. Identificación del antígeno flagelar (H) de salmonella (prueba en portaobjetos):

El procedimiento es el mismo que para la identificación de antígenos somáticos, excepto que utiliza el crecimiento en fase líquida a partir de un medio semisólido con un tubo de Craigie o el crecimiento en el líquido de agar inclinado. Si se utiliza el cultivo líquido no hay que hacer suspensiones salinas. La detección de antígenos flagelares puede hacerse normalmente mediante pruebas de aglutinación en portaobjetos; sin embargo, algunas cepas son poco flagelares y solo pueden identificarse mediante pruebas de aglutinación en tubo.

### C. Identificación del antígeno somático, Vi y H de salmonella (prueba en tubo):

- Preparación de las suspensiones celulares para las pruebas: Prepare una suspensión densa de la bacteria en una solución salina normal y deje hervir durante 10 minutos o utilice células deshidratadas con alcohol y resuspendidas en solución salina normal en el tubo Browns 2 para identificar antígenos somáticos. Prepare un cultivo muerto en forma de caldo para identificar el antígeno «H». Suspense las colonias sospechosas de «Vi» en solución salina formalizada al 0,5 % en el tubo 2 de Brown para identificar los antígenos «Vi».
- Dilución de los sueros: Para usar el suero aglutinante de salmonella en un tubo de ensayo, cada suero debe diluirse 1:5 en solución salina normal antes de usarlo.
- Añada 150 µl de solución salina normal en un tubo de ensayo de cristal y añada en otro tubo un volumen igual de suero aglutinante diluido.
- Añada a cada tubo un volumen igual de suspensión celular previamente preparada.
- Deje incubar en un baño maría a 37 °C durante 2 horas para identificar los antígenos flagelares o entre 5 y 18 horas para la identificación somática o «Vi». Para algunas bacterias, es preferible la incubación a 50 °C.
- Deje reposar los tubos en el soporte durante 30 minutos. Observe si se produce aglutinación. Puede que sea necesario girar los tubos para alterar los gránulos, pero sin agitar.
- No debe verse aglutinación en el tubo de control. Si se ha producido autoaglutinación en el control, deseche los tubos y repita la prueba.

### D. Identificación del antígeno flagelar (H) de salmonella con los sueros rápidos de diagnóstico de salmonella:

Los sueros rápidos de diagnóstico de salmonella se usan en combinación para determinar el grupo flagelar.

- Para el procedimiento de identificación del antígeno flagelar (H) de salmonella mediante la prueba en portaobjetos, consulte el procedimiento B.
- Para el procedimiento de identificación del antígeno flagelar (H) de salmonella mediante la prueba en tubo, consulte el procedimiento C.

## PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD

Consulte el certificado de análisis correspondiente del lote.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Para el procedimiento A o B:  
Una aglutinación clara (aglutinación granular) en 60 segundos, sin autoaglutinación en el control salino, se considera un resultado positivo. Los resultados positivos pueden confirmarse mediante pruebas de aglutinación en tubo.
- Para el procedimiento C:  
La aglutinación granular observada en el tubo se considera un resultado positivo para identificar el antígeno «O», en cambio, un aspecto más flocular observado con una luz intensa sobre un fondo negro se considera un resultado positivo para identificar el antígeno «H».
- Para el procedimiento D:  
i) Los resultados positivos se interpretan para la prueba en portaobjetos como en el punto 1.  
ii) Los resultados positivos se interpretan para la prueba en tubo como en el punto 2.  
iii) Para interpretar los resultados de los sueros rápidos de diagnóstico de salmonella 1, 2 y 3 como panel, consulte la tabla siguiente:

Sueros	Grupo flagelar de salmonella						
	b	d	E	G	k	L	r
Suero rápido de diagnóstico de salmonella 1	+	+	+	-	-	-	+
Suero rápido de diagnóstico de salmonella 2	+	-	+	-	+	+	-
Suero rápido de diagnóstico de salmonella 3	-	+	+	+	+	-	-

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El suero aglutinante solo debe utilizarse para identificar cultivos que hayan sido previamente considerados bioquímicamente como salmonella. No se ha comprobado la presencia de antígenos similares en la superficie de bacterias distintas de la salmonella, por lo que puede dar falsos resultados.
- Las cepas rugosas se autoaglutinarán, dando falsos resultados positivos. Por lo tanto, debe incluirse un control de solución salina normal en cada prueba para garantizar la especificidad de la reacción.
- Se recomienda comprobar la potencia del suero aglutinante de salmonella con cultivos madre de estructura antigenica conocida.

- Aunque la mayoría de las cepas de salmonella que poseen los antígenos apropiados se aglutinará con el antisuero homólogo, debido a pequeñas diferencias, por ejemplo, en la expresión antigénica entre cepas del mismo serotipo y colonias individuales por variación de forma (5), no puede garantizarse la aglutinación en todos los casos.
- La sensibilidad de la prueba en portaobjetos podría reducirse si se utilizan volúmenes superiores a 10 µl.

## REFERENCIAS

- Bergan T. (Ed) 1984. Serology Of Salmonella. *Methods in Microbiology*. Vol 15. Lindberg A, Minor L-1-141.
- Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th Ed. *Eisevier Science Publishing Co.*, New York.
- Kauffmann, F. 2001. The Bacteriology of Enterobacteriaceae. *The Williams & Wilkins Co.*, Baltimore.
- 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.

	= Use by
	= Lot number
	= Catalogue number
	= Manufacturer
	= Authorized Representative in the European Community
	= Contains sufficient for <n> tests
	= In vitro diagnostic medical device
	= Temperature limitation
	= Consult instructions for use

**EC REP** Advena Ltd. Tower Business Centre, 2<sup>nd</sup> Floor,  
Tower Street, Swatara, BKR 4013, Malta.

