

Antígenos bacterianos MonlabTest®



Aglutinación en porta y tubo

Determinación cualitativa de anticuerpos febriles

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar a 2-8 °C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los Antígenos Bacterianos son una técnica de aglutinación en porta y tubo para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti-Salmonella, Brucella y Proteus en suero humano. Los reactivos, suspensiones bacterianas, coloreadas y estandarizadas, aglutinan en presencia del anticuerpo homólogo en las muestras ensayadas.

SIGNIFICADO CLÍNICO

El diagnóstico de enfermedades febriles puede establecerse bien sea por el aislamiento del microorganismo en sangre, orina o heces o por la demostración del título de anticuerpos específicos, somáticos (O) y flagelares (H) en el suero del paciente. La determinación de estos anticuerpos forma las bases para el ensayo de Widal que establece que altos niveles de anticuerpos O y H superiores a 1/100 en suero, es indicativo de infección por estos microorganismos.

REACTIVOS

REACTIVO	ANTÍGENO	REFERENCIA	TAMAÑO
<i>Salmonella paratyphi AH</i>	a flagelar	MO-165001	5 mL (100 Tests)
<i>Salmonella paratyphi AO</i>	1,2,12, somático	MO-165002	
<i>Salmonella paratyphi BH</i>	b flagelar	MO-165003	
<i>Salmonella paratyphi BO</i>	1,4,5,12 somático	MO-165004	
<i>Salmonella paratyphi CH</i>	c flagelar	MO-165005	
<i>Salmonella paratyphi CO</i>	6,7 somático	MO-165006	
<i>Salmonella typhi H</i>	d flagelar	MO-165007	
<i>Salmonella typhi O</i>	1,9,12 somático	MO-165008	
<i>Brucella abortus *</i>	somático	MO-165009	
<i>Brucella melitensis</i>	somático	MO-165010	
<i>Proteus OX2</i>	somático	MO-165011	
<i>Proteus OX19</i>	somático	MO-165012	
<i>Proteus OXK</i>	somático	MO-165013	
Control +		MO-165014	1 mL
Control -		MO-165015	

(*) : Adecuada también para determinación de anticuerpos anti-Br. suis

PRECAUCIONES

R: EUH208-Contiene Formaldehído. Puede provocar una reacción alérgica. EUH210-Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

Control +/- : H317-Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Contienen 2-Metilisotiazol-3(2H)-ona (Proclin 950).

Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto

COMPOSICIÓN DE LOS REACTIVOS

- Antígenos Bacterianos: Suspensión de Salmonellas, Brucellas y Proteus en tampón glicina, pH 8,2. Conservante.
- Controles: Suero animal. Conservante.

CALIBRACIÓN

No existe referencia internacional para la estandarización de la sensibilidad de estos reactivos, por lo que se utiliza un control interno constituido por suero animal que contiene anticuerpos frente a cada uno de los antígenos citados anteriormente y que ha sido titulado con reactivos comerciales de calidad reconocida.

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

Antígenos Bacterianos: Listos para el uso

Controles: Listos para el uso.

Mezclar los reactivos suavemente antes de usar.

Indicadores de deterioro de los reactivos: Presencia de partículas y agregados.

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No congelar.

MATERIAL ADICIONAL

- Agitador rotatorio de velocidad regulable a 80-100 r.p.m.
- Estufa a 37°C / - Agitador vortex / - Pipetas de 50 µL.

MUESTRAS

Suero fresco. Estable 8 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas antes de la prueba. No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

A. Método de aglutinación en porta (cualitativo)

1. Dejar atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. La sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
2. Depositar 50 µL de la muestra a ensayar ^(Nota 1 y 2) y 1 gota (50 µL) de cada control en círculos separados de un porta.
3. Mezclar el reactivo vigorosamente o con el agitador vortex antes del ensayo. Añadir una gota (50 µL) de antígeno próxima a la muestra a ensayar.
4. Mezclar con ayuda de un palillo, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo.
5. Situar el porta sobre un agitador rotatorio a 80-100 r.p.m., durante 1 minuto.

B. Método de aglutinación en porta (titulación)

1. Utilizando una micropipeta, dispensar 80, 40, 20, 10 y 5 µL de muestra no diluida en círculos separados de un porta.
2. Depositar 1 gota (50 µL) de antígeno en cada círculo próximo a la muestra a ensayar.
3. Mezclar con ayuda de un palillo, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo.
4. Situar el porta sobre un agitador rotatorio a 80-100 r.p.m., durante 1 minuto.

C. Método de aglutinación en tubo (semicuantificación)

1. Preparar una serie de tubos tal como sigue:

Diluciones	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	...
Muestra (µL)	100	--	--	--	--	--	...
NaCl 9 g/L (mL)	1,9	1	1	1	1	1	...
	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL desechar

2. Preparar 2 tubos más para Control Positivo y Negativo: 0,1 mL Control + 0,9 mL NaCl 9 g/L.

3. Añadir una gota (50µL) de antígeno a cada tubo.

4. Agitar e incubar los tubos a 37°C durante 24 h ^(Nota 3).

LECTURA E INTERPRETACIÓN ^(NOTA 4)

Método de aglutinación en porta

Examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar el porta del agitador y comparar los resultados con los sueros control.

Los resultados obtenidos en el método de titulación en porta, son aproximadamente equivalentes a los que se obtendrían en el método de aglutinación en tubo con diluciones del suero de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 respectivamente. Cualquier resultado positivo, es aconsejable confirmar el título mediante el método de aglutinación en tubo.

Método de aglutinación en tubo

Examinar macroscópicamente el modelo de aglutinación ^(Nota 5) y comparar los resultados con los obtenidos en los tubos control.

El control positivo debe mostrar aglutinación parcial o completa. El Control negativo no debe mostrar ningún tipo de aglutinación.

Se considera como resultado positivo cualquier grado de aglutinación parcial o completa, con diversos grados de clarificación del sobrenadante. El título de la muestra se define como la dilución mayor que muestra resultado positivo.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar el control positivo y negativo para controlar la funcionalidad de los reactivos, así como modelo de comparación para la interpretación de resultados.

Todo resultado distinto al resultado que da el control negativo, se considerará positivo.

VALORES DE REFERENCIA

Son indicativos de infección reciente:

Salmonellas: Títulos $\geq$ 1/80 (anticuerpos somáticos) y $\geq$ 1/160 (anticuerpos flagelares).

Brucellas: Títulos $\geq$ 1/80.

Proteus: Una elevada proporción de individuos normales da resultados positivos con los antígenos de *Proteus*, especialmente en el ensayo de aglutinación en porta. Un título inferior a 1/160 no debe considerarse significativo.

El nivel normal de anticuerpos febriles varía ampliamente según los diferentes países y comunidades. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Todas las características diagnósticas de los distintos reactivos de Antígenos Bacterianos pueden encontrarse en los correspondientes Informes Técnicos que se encuentran a disposición del usuario que lo solicite.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (20 mg/dL), hemoglobina (10 g/L), lípidos (10 g/L) y factores reumatoides (300 UI/mL) no interfieren.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

- Las infecciones recientes, la inmunodepresión, el efecto prozona (Brucelosis) y la terapia con antibióticos (somáticos), pueden ocasionar falsos negativos.
- Se han descrito reacciones cruzadas con Brucela en casos de infección o vacunación con algunas cepas de *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus OX19* e *Y. enterocolitica* (serotipo 9).

NOTAS

1. En los ensayos de anticuerpos anti-Brucela, se recomienda reducir la muestra a 20 µL para evitar el efecto prozona.
2. En determinadas áreas geográficas, con elevada prevalencia de enfermedades febriles, se recomienda diluir la muestra 1/4 en NaCl 9 g/L antes de realizar el ensayo en porta.
3. Se puede acelerar los tiempos de incubación de la siguiente manera:
 - Antígenos somáticos (O) y Proteus: 48-50°C, 4 h.
 - Antígenos flagelares (H): 48-50°C, 2 h.
4. Un resultado positivo aislado es menos significativo que una variación de títulos obtenidos en ensayos realizados a distintos intervalos de tiempo. El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados del laboratorio, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.
5. La aglutinación somática se caracteriza por ser fina y granular, de formación lenta y difícilmente disgregable. La aglutinación flagelar es algodonosa, de formación rápida y fácilmente disgregable.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edward J Young. Clinical Infectious Diseases 1995; 21: 283-290.
2. Coulter JBS. Current Pediatrics 1996; 6: 25-29.
3. David A et al. Current Opinion in Infectious Diseases 1994; 7: 616-623.
4. David R et al Current Opinion in Infectious Diseases 1993; 6: 54-62.
5. Bradley D Jones. Annu Rev Immunol 1996; 14: 533 – 61.

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante		Uso de diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> test		Manténgase fuera de la luz del sol
	Código		Límite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad



Bacterial Antigens MonlabTest®



Slide and tube agglutination test



Qualitative determination of febrile antibodies

Only for professional *in vitro* diagnostic use. Store at 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The Bacterial Antigens is a slide and tube agglutination test for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies anti-Salmonella, Brucella and certain Rickettsias in human serum. The reagents, standardized suspensions of killed and stained bacteria, agglutinate when mixed with samples containing the homologous antibody.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Febrile diseases diagnostic may be assessed either by microorganism isolation in blood, stools or urine, or by titration of specific antibodies, somatic (O) and flagellar (H). The detection of these antibodies forms the basis for the long-established Widal test. This test dictates that a serum with high levels of agglutinating antibodies to O and H >1/100 is indicative of the infection with these microorganisms.

REAGENTS

REAGENT	ANTIGEN	REF	SIZE
<i>Salmonella paratyphi</i> AH	a flagellar	MO-165001	5 mL (100 Tests)
<i>Salmonella paratyphi</i> AO	1, 2, 12, somatic	MO-165002	
<i>Salmonella paratyphi</i> BH	b flagellar	MO-165003	
<i>Salmonella paratyphi</i> BO	1, 4, 5, 12 somatic	MO-165004	
<i>Salmonella paratyphi</i> CH	c flagellar	MO-165005	
<i>Salmonella paratyphi</i> CO	6, 7 somatic	MO-165006	
<i>Salmonella typhi</i> H	d flagellar	MO-165007	
<i>Salmonella typhi</i> O	1, 9, 12 somatic	MO-165008	
<i>Brucella abortus</i> (*)	somatic	MO-165009	
<i>Brucella melitensis</i>	somatic	MO-165010	
<i>Proteus</i> OX2	somatic	MO-165011	1 mL
<i>Proteus</i> OX19	somatic	MO-165012	
<i>Proteus</i> OXK	somatic	MO-165013	
Control +		MO-165014	1 mL
Control -		MO-165015	

(*): Useful also for *Brucella suis* antibodies.

PRECAUTIONS

R: EUH208-Contains formaldehyde. May produce an allergic reaction. EUH210-Safety data sheet available on request
Control +/- : H317-May cause an allergic skin reaction. Contain 2-Methylisothiazol-3(2H)-one (Proclin 950).
Follow the precautionary advice given in the SDS and the product label.

REAGENTS COMPOSITION

- Bacterial Antigens: Suspensions of Salmonellas, Brucellas and Proteus in glycine buffer, pH 8.2. Preservative
- Controls: Animal serum. Preservative

CALIBRATION

There is not any International Reference for the sensitivity standardization of these reagents. For this reason, we use an internal control that contains animal serum with antibodies anti-Salmonellas, Brucellas and Proteus, and titrated with commercial reagents of certified quality.

PREPARATION AND STABILITY

Antigen suspensions: Ready to use.
Controls: Ready to use.
Mix reagents gently before use.
Reagents deterioration: Presence of particles and clumps.
All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored at 2-8°C, protected from light and contaminations. Do not freeze.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Mechanical rotator adjustable to 80-100 r.p.m.
- Heater at 37°C. / - Vortex mixer. / - Pippetes 50 µL.

SAMPLES

Fresh serum. Stable 8 days at 2-8°C or 3 months at -20°C.
The samples with presence of fibrin should be centrifuged before testing.
Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

- A. Slide agglutination method (qualitative test)
 1. Bring the reagents and samples to room temperature. The sensitivity of the test may be reduced at low temperatures.
 2. Place 50 µL of the sample to be tested (Note 1, 2) and 1 drop of each control into separate circles on the slide test.
 3. Mix the antigen vial vigorously or on a vortex mixer before using. Add 1 drop (50 µL) of antigen to each circle next to the sample to be tested.
 4. Mix with a disposable stirrer and spread over the entire area enclosed by the circle.
 5. Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m., for 1 minute.
- B. Slide agglutination method (titration)
 1. Using a micropipette, deliver 80, 40, 20, 10 and 5 µL of undiluted serum into separate circles of the slide test.
 2. Place 1 drop (50µL) of the antigen to each circle next to the sample to be tested.
 3. Mix with a disposable stirrer and spread over the entire area enclosed by the circle.
 4. Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m., for 1 minute.

C. Tube agglutination method

1. Prepare a row of tube test for each sample as follows:

Dilutions	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	...
Sample (µL)	100	--	--	--	--	--	...
NaCl 9 g/L (mL)	1.9	1	1	1	1	1	...
	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL discard

2. Prepare 2 tubes for Positive and Negative control: 0.1 mL Control + 0.9 mL NaCl 9 g/L.
3. Add a drop (50µL) of antigen suspension to each tube.
4. Mix thoroughly and incubate tube test at 37°C for 24 h (Note 3).

READING AND INTERPRETATION (NOTE 4)

Slide agglutination method

Examine macroscopically the presence or absence of clumps within 1 minute after removing the slide from the rotator comparing test results with control serums.

The reactions obtained in the slide titration method, are roughly equivalent to those which would occur in tube test with serum dilutions of 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 and 1/320 respectively. If a reaction is found it is advisable to confirm the reaction and establish the titer by a tube test.

Tube agglutination test

Examine macroscopically the pattern of agglutination (Note 5) and compare the results with those given by all control tubes. Positive control should give partial or complete agglutination. Negative Control should not give visible clumping. Partial or complete agglutination with variable degree of clearing of the supernatant fluid is recorded as a positive.
The serum titer is defined as the highest dilution showing a positive result.

QUALITY CONTROL

Positive and Negative controls are recommended to monitor the performance of the procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation. All result different from the negative control result, will be considered as a positive.

REFERENCE RANGES

Salmonellas: Titers ≥ 1/80 (O antibodies) and ≥ 1/160 (H antibodies) indicates recent infection.

Brucellas: Titers ≥ 1/80 indicate infection.

Proteus: A great number of false positive reactions have been reported in healthy individuals with *Proteus* antigens, especially in slide agglutination test. A titer of less than 1/160 should not be considered significant.

The level of "normal" agglutinins to these organisms varies in different countries and different communities. It is recommended that each laboratory establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

All the performance characteristics of the Bacterial Antigens may be found in the corresponding Technical Report and they are available on request.

INTERFERENCES

Bilirubin (20 mg/dL), hemoglobin (10 g/L), lipids (10 g/L) and rheumatoid factors (300 IU/mL), do not interfere.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

- False negative results can be obtained in early disease, immune-unresponsiveness, prozone (Brucellosis), and antibiotic treatment (somatic).
- Serological cross-reactions with *Brucella* have been reported in cases of infection or vaccination with some strains of *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus* OX19 and *Y. enterocolitica* (serotype 9).

NOTES

1. When testing for *Brucella* antibodies it is recommended to reduce sample volume to 20 µL in order to avoid prozone.
2. In some geographical areas with a high prevalence of febrile antibodies, it is recommended to dilute the sample 1/4 in NaCl 9 g/L before to perform the assay.
3. The incubation procedure may be accelerated incubating as follows:
 - Somatic (O) and *Proteus* antigens: 48-50°C for 4 h.
 - Flagellar (H) antigens: 48-50°C for 2 h.
4. A single positive result has less significance than the demonstration of a rising or falling antibodies titer as evidence of infection. A clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result but should integrate both clinical and laboratory data.
5. A somatic reaction (O) is characterized by coarse, compact agglutination, which tends to be difficult to disperse, while flagellar (H) has a characteristic loose, flocculant agglutination.

BIBLIOGRAPHY

1. Edward J Young. Clinical Infectious Diseases 1995; 21: 283-290.
2. Coulter JBS. Current Pediatrics 1996; 6: 25-29.
3. David A et al. Current Opinion in Infectious Diseases 1994; 7: 616-623.
4. David R et al Current Opinion in Infectious Diseases 1993; 6: 54-62.
5. Bradley D Jones. Annu Rev Immunol 1996; 14: 533 - 61.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS



Manufacturer



For *in vitro* diagnostic use only



Don't re-use



Consult instructions for use



Contains sufficient for <n> tests



Keep out of the sunlight



Catalogue Code



Temperature limitation



Lot Number



Use by

