



BACTERIAL ANTIGENS

# Bacterials Antigens

Slide and tube agglutination



BACTERIAL ANTIGENS

# Antígenos Bacterianos

Agglutinación en porta y tubo

## Qualitative determination of febrile antibodies IVD

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 microorganism.

### REAGENTS

REAGENT	Antigen	Ref.	Size	
<i>Salmonella paratyphi AH</i>	a flagellar	1205011	5 mL	
<i>Salmonella paratyphi AO</i>	1,2,12, somatic	1205021		
<i>Salmonella paratyphi BH</i>	b flagellar	1205031		
<i>Salmonella paratyphi BO</i>	1,4,5,12 somatic	1205041		
<i>Salmonella paratyphi CH</i>	c flagellar	1205051		
<i>Salmonella paratyphi CO</i>	6,7 somatic	1205061		
<i>Salmonella typhi H</i>	d flagellar	1205071		
<i>Salmonella typhi O</i>	1,9,12 somatic	1205081		
<i>Brucella abortus</i> (*)	somatic	1205091		
<i>Brucella melitensis</i>	somatic	1205097		
<i>Proteus OX2</i>	somatic	1205101		
<i>Proteus OX19</i>	somatic	1205111		
<i>Proteus OXK</i>	somatic	1205121		
Control +		1205201		1 mL
Control -		1205211		
Bacterial Antigens Kit		1205006		4 x 5 mL
		1205008	8 x 5 mL - 2 x 1 mL	
		1205010	6 x 5 mL - 2 x 1 mL	

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

Different correlative letters to the reference correspond to different variables of presentation.

### 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, Spinreact uses 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. - Pipettes 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 hemolized or lipemic samples.

### PROCEDURE

#### A. Slide agglutination method (qualitative test)

- Bring the reagents and samples to room temperature. The sensitivity of the test may be reduced at low temperatures.
- Place 50 µL of the sample to be tested (Note 1 and 2) and 1 drop of each control into separate circles on the slide test.
- 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.
- Mix with a disposable stirrer and spread over the entire area enclosed by the circle.
- Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m., for 1 minute.

#### B. Slide agglutination method (titration)

- Using a micropipette, deliver 80, 40, 20, 10 and 5 µL of undiluted serum into separate circles of the slide test.
- Place 1 drop (50 µL) of the antigen to each circle next to the sample to be tested.
- Mix with a disposable stirrer and spread over the entire area enclosed by the circle.
- Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m., for 1 minute.

#### C. Tube agglutination method

- 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 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL discard

- Prepare 2 tubes for Positive and Negative control: 0.1 mL Control + 0.9 mL NaCl 9 g/L.

- Add a drop (50 µL) of antigen suspension to each tube.

- Mix thoroughly and incubate tube test at 37°C for 24 h (Nota 3).

### READING AND INTERPRETATION (Nota 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  $\geq$  1/80 (O antibodies) and  $\geq$  1/160 (H antibodies) indicates recent infection. *Brucellas*: Titers  $\geq$  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

- When testing for Brucella antibodies it is recommended to reduce sample volume to 20 µL in order to avoid prozone.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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

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

## Determinación cualitativa de anticuerpos febriles IVD

Conservar a 2 - 8°C.

### PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los Antígenos Bacterianos son una técnica de agglutinación 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, agglutinan en presencia del anticuerpo homólogo correspondiente 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	Ref.	Presentación	
<i>Salmonella paratyphi AH</i>	a flagelar	1205011	5 mL	
<i>Salmonella paratyphi AO</i>	1,2,12, somático	1205021		
<i>Salmonella paratyphi BH</i>	b flagelar	1205031		
<i>Salmonella paratyphi BO</i>	1,4,5,12 somático	1205041		
<i>Salmonella paratyphi CH</i>	c flagelar	1205051		
<i>Salmonella paratyphi CO</i>	6,7 somático	1205061		
<i>Salmonella typhi H</i>	d flagelar	1205071		
<i>Salmonella typhi O</i>	1,9,12 somático	1205081		
<i>Brucella abortus</i> *	somático	1205091		
<i>Brucella melitensis</i>	somático	1205097		
<i>Proteus OX2</i>	somático	1205101		
<i>Proteus OX19</i>	somático	1205111		
<i>Proteus OXK</i>	somático	1205121		
Control +		1205201		1 mL
Control -		1205211		
Kit de Antígenos Febriles		1205006		4 x 5 mL
		1205008	8 x 5 mL - 2 x 1 mL	
		1205010	6 x 5 mL - 2 x 1 mL	

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

Diferentes letras correlativas a la referencia, corresponden a distintas variables de presentación.

### 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 agglutinación en porta (cualitativo)

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

#### B. Método de aglutinación en porta (titulación)

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

#### C. Método de aglutinación en tubo (semicuantificación)

- 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 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL desechar

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

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

- 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 generalmente indicativos de infección reciente: *Salmonellas*: Titulos  $\geq$  1/80 (anticuerpos somáticos) y  $\geq$  1/160 (anticuerpos flagelares). *Brucellas*: Titulos  $\geq$  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 en tubo, 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 IU/mL), no interfieren.

### LIMITACIONES DEL MÉTODO

- Las infecciones recientes, la inmunodepresión, el efecto prozona (Brucellosis) y la terapia con antibióticos (somáticos), pueden ocasionar falsas negatividades.

- Se han descrito reacciones cruzadas con *Brucella* en casos de infección o vacunación con algunas cepas de *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus OX19* y *Y. enterocolitica* (serotipo 9).

### NOTAS

- En los ensayos de anticuerpos anti-Brucella, se recomienda reducir la muestra a 20 µL para evitar el efecto prozona.
- En determinadas áreas geográficas, con elevada prevalencia de enfermedades febriles, se recomienda diluir la muestra 1/4 en CINA 9 g/L antes de realizar el ensayo en porta.
- 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.
- 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.
- 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

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

## Détermination qualitative d'anticorps fébriles IVD

Conservé à 2 - 8 °C.

### PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les Antigènes bactériens sont une technique d'agglutination sur lame et en tube pour la détection et la semi-quantification d'anticorps anti-Salmonelle, Brucella et Proteus dans le sérum humain. Les réactifs, des suspensions bactériennes colorées et standardisées, s'agglutinent en présence de l'anticorps homologue correspondant dans les échantillons testés.

### SIGNIFICATION CLINIQUE

Le diagnostic de maladies fébriles peut s'effectuer soit par l'isolement du microorganisme dans le sang, l'urine ou les selles, soit par la démonstration du titrage d'anticorps spécifiques, somatiques (O) et flagellaires (H) dans le sérum du patient. La détermination de ces anticorps constitue la base de l'essai de Widal, qui établit que des niveaux élevés d'anticorps O et H supérieurs à 1/100 dans le sérum indiquent une infection par ces microorganismes.

### RÉACTIFS

RÉACTIF	Antigène	Ref.	Présentation
<i>Salmonella paratyphi AH</i>	a flagellaire	1205011	5 mL
<i>Salmonella paratyphi AO</i>	1,2,12, somatique	1205021	
<i>Salmonella paratyphi BH</i>	b flagellaire	1205031	
<i>Salmonella paratyphi BO</i>	1,4,5,12 somatique	1205041	
<i>Salmonella paratyphi CH</i>	c flagellaire	1205051	
<i>Salmonella paratyphi CO</i>	6,7 somatique	1205061	
<i>Salmonella typhi H</i>	d flagellaire	1205071	
<i>Salmonella typhi O</i>	1,9,12 somatique	1205081	
<i>Brucella abortus</i> *	somatique	1205091	
<i>Brucella melitensis</i>	somatique	1205097	
<i>Proteus OX2</i>	somatique	1205101	
<i>Proteus OX19</i>	somatique	1205111	
<i>Proteus OXK</i>	somatique	1205121	
Control +		1205201	
Control -		1205211	
Kit Antigènes bactériens		1205006	4 x 5 mL
		1205008	8 x 5 mL - 2 x 1 mL
		1205010	6 x 5 mL - 2 x 1 mL

(\*): Convient également à la détermination d'anticorps anti-*Br. suis*.

**Différentes lettres corrélatives à la référence, correspondent aux différents variables de présentation.**

### COMPOSITION DES RÉACTIFS

- **Antigènes bactériens:** suspension de Salmonelles, Brucellas et Proteus en tampon de glycine, pH 8,2. Conservateur.  
- **Témoins:** sérum animal. Conservateur.

### ÉTALONNAGE

Il n'existe pas de référence internationale pour la standardisation de la sensibilité de ces réactifs, c'est pourquoi on utilise un témoin interne constitué de sérum animal contenant des anticorps face à chacun des antigènes précédemment cités, et titré avec des réactifs commerciaux de qualité reconnue.

### PRÉPARATION ET STABILITÉ

Antigènes bactériens: prêts à l'usage.

Témoins: prêts à l'usage. Mélangez doucement les réactifs avant utilisation.

**Indicateurs de dégradation des réactifs:** présence de particules et d'agrégats. Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage si les flacons sont conservés bien fermés à 2-8°C, à l'abri de la lumière et si toute contamination est évitée lors de l'utilisation. Ne pas congeler.

### MATÉRIEL ADDITIONNEL

- Agitateur tournant à vitesse variable 80-100 tr/min - Etuve à 37°C - Agitateur/Vortex - Pipettes de 50 µL

### ÉCHANTILLONS

Sérum frais. Stable 8 jours à 2-8°C ou 3 mois à -20°C.

Les échantillons contenant des restes de fibrine doivent être centrifugés avant l'essai. Ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolisés ou lipémiques.

### PROCÉDURE À SUIVRE.

#### Méthode d'agglutination sur lame (qualitatif)

- Laisser reposer les réactifs et les échantillons à température ambiante. La sensibilité de l'essai se réduit à basses températures.
- Déposer 50 µL de l'échantillon à tester (remarque 1 et 2) et 1 goutte (50 µL) de chaque témoin en cercles séparés sur une lame.
- Mélanger le réactif vigoureusement ou avec l'agitateur vortex avant l'essai. Ajouter une goutte (50 µL) de l'antigène à proximité de l'échantillon à tester.
- Mélanger à l'aide d'un agitateur, en essayant d'étaler le mélange sur toute la surface interne du cercle.
- Placer la lame sur un agitateur tournant à 80-100 tr/min pendant 1 minute.

#### B. Méthode d'agglutination sur lame (titrage)

- À l'aide d'une micropipette, disposer 80, 40, 20, 10 et 5 µL d'échantillon non dilué en cercles séparés sur une lame.
- Déposer une goutte (50 µL) de l'antigène dans chaque cercle à proximité de l'échantillon à tester.
- Mélanger à l'aide d'un agitateur, en essayant d'étaler le mélange sur toute la surface interne du cercle.
- Placer la lame sur un agitateur tournant à 80-100 tr/min pendant 1 minute.

#### C. Méthode d'agglutination en tube (semi-quantification)

- Préparer une série de tube comme suit:

Dilutions	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	...
Échantillon (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 écarter

- Préparer 2 tubes supplémentaires pour les témoins positif et négatif : 0,1 mL témoin + 0,9 mL NaCl 9 g/L.
- Ajouter une goutte (50 µL) d'antigène dans chaque tube.
- Agiter et incubé les tubes à 37°C pendant 24 h (remarque 3).

### LECTURE ET INTERPRÉTATION (remarque 4)

#### Méthode d'agglutination sur lame

Examiner de manière macroscopique la présence ou l'absence d'agglutination juste après avoir retiré l'échantillon de l'agitateur et comparer les résultats avec les sérums témoins.

Les résultats obtenus par la **méthode de titrage sur lame** sont approximativement équivalents à ceux pouvant être obtenus par la méthode d'agglutination en tube avec des dilutions de sérum de respectivement 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320. Pour chaque résultat positif, il est conseillé de confirmer le titre par la méthode d'agglutination en tube.

#### Méthode d'agglutination en tube

Examiner de manière macroscopique le modèle d'agglutination (remarque 5) et comparer les résultats avec ceux obtenus dans les tubes témoins. Le résultat positif doit montrer une agglutination partielle ou complète. Le témoin négatif ne doit montrer aucun type d'agglutination. Un résultat est considéré positif en présence de tout niveau d'agglutination partielle ou complète, avec divers niveaux de clarification du surnageant. Le titre de l'échantillon est défini comme étant la dilution la plus élevée montrée par le résultat positif.

### CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser les témoins positif et négatif pour contrôler la fonctionnalité des réactifs, et en tant que modèle de comparaison pour l'interprétation des résultats. Tout résultat autre que le résultat qui donne le contrôle négatif est considéré comme positif.

### VALEURS DE RÉFÉRENCE

Ils sont généralement indicateurs d'une infection récente: *Salmonellas*: titres  $\geq 1/80$  (anticorps somatiques) et  $\geq 1/160$  (anticorps flagellaires). *Brucellas*: titres  $\geq 1/80$ . *Proteus*: Une proportion élevée d'individus normaux donne des résultats positifs avec les antigènes de Proteus, notamment avec le test d'agglutination sur lame. Un titre inférieur à 1/160 en tube ne doit pas être considéré comme significatif. Le niveau normal d'anticorps fébriles varie amplement en fonction des différents pays et communautés. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

### CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

Toutes les caractéristiques diagnostiques par les différents réactifs d'Antigènes bactériens sont consultables dans les Rapports techniques correspondants qui sont à la disposition de tout usager qui en fait la demande.

### INTERFÉRENCES

Pas d'interférence avec la bilirubine (20mg/dL), l'hémoglobine (10g/L), les lipides (10g/L), les facteurs rhumatoïdes (300UI/mL).

### LIMITES DE LA MÉTHODE

- Les infections récentes, l'immunodépression, l'effet prozone (Brucellose) et la thérapie avec antibiotiques (somatiques) peuvent occasionner de fausses négativités.
- Des réactions croisées avec *Brucella* ont été décrites en cas d'infection ou de vaccination avec certaines souches *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus OX19* et *Y. enterocolitica* (sérotype 9).

### REMARQUES

- Dans les essais d'anticorps anti-*Brucella*, il est recommandé de réduire l'échantillon à 20 µL pour éviter l'effet prozone.
- Dans certaines zones géographiques, où l'apprévalence de maladies fébriles est élevée, il est recommandé de diluer l'échantillon 1/40 dans CiNa 9 g/L avant de réaliser le test sur lame.
- Il est possible d'accélérer les temps d'incubation de la manière suivante:
  - Antigènes somatiques (O) et Proteus: 48-50°C, 4 h.
  - Antigènes flagellaires (H): 48-50°C, 2 h.
- Un résultat positif isolé est moins significatif qu'une variation de titres obtenus lors d'essais réalisés à différents intervalles de temps. Le diagnostic clinique ne doit pas uniquement se faire à partir des résultats du laboratoire; les données cliniques du patient doivent être prises en compte en même temps.
- L'agglutination somatique se caractérise par un aspect fin et granulaire, de formation lente et difficilement désagrégeable. L'agglutination flagellaire est cotonneuse, de formation rapide et facilement désagrégeable.

### BIBLIOGRAPHIE

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

## Determinação qualitativa de anticorpos febris IVD

Conservar a 2 - 8°C.

### PRINCÍPIO DO METODO

Os Antígenos Bacterianos são uma técnica de agglutinação em porta e em tubo para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-Salmonella, Brucella e Proteus no soro humano. Os reagentes, suspensões bacterianas, coradas e standardizadas, aglutinam na presença do anticorpo homólogo correspondente nas amostras testadas.

### SIGNIFICADO CLINICO

O diagnóstico de doenças febris pode ser feito tanto pelo isolamento do organismo no sangue, urina ou fezes como pela demonstração do título de anticorpos específicos, somáticos (O) e flagelares (H) no soro do paciente. A determinação destes anticorpos forma as bases para o ensaio de Widal que estabelece que elevados níveis de anticorpos O e H superiores a 1/100 no soro, é indicativo de infecção por estes microorganismos.

### REAGENTES

REAGENTE	Antigénio	Ref.	Apresentação
<i>Salmonella paratyphi AH</i>	a flagelar	1205011	5 mL
<i>Salmonella paratyphi AO</i>	1,2,12, somático	1205021	
<i>Salmonella paratyphi BH</i>	b flagelar	1205031	
<i>Salmonella paratyphi BO</i>	1,4,5,12 somático	1205041	
<i>Salmonella paratyphi CH</i>	c flagelar	1205051	
<i>Salmonella paratyphi CO</i>	6,7 somático	1205061	
<i>Salmonella typhi H</i>	d flagelar	1205071	
<i>Salmonella typhi O</i>	1,9,12 somático	1205081	
<i>Brucella abortus</i> (*)	somático	1205091	
<i>Brucella melitensis</i>	somático	1205097	
<i>Proteus OX2</i>	somático	1205101	
<i>Proteus OX19</i>	somático	1205111	
<i>Proteus OXK</i>	somático	1205121	
Control +		1205201	
Control -		1205211	
Kit de Antígenos Bacterianos		1205006	4 x 5 mL
		1205008	8 x 5 mL - 2 x 1 mL
		1205010	6 x 5 mL - 2 x 1 mL

(\*): Adequada também para a determinação de anticorpos anti-*Br. suis*.

**Letras diferentes associadas a referência, correspondem a variáveis de apresentação diferentes.**

### COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES

- **Antígenos Bacterianos:** Suspensão de Salmonellas, Brucellas e Proteus em tampão glicina, pH 8,2. Conservante.  
- **Controles:** Soro animal. Conservante.

### CALIBRAÇÃO

Não existe referência internacional para a standardização da sensibilidade destes reagentes, pelo que se utiliza um controlo interno constituído por soro animal que contém anticorpos frente a cada um dos antígenos citados anteriormente e que foi titulado com reagentes comerciais de qualidade reconhecida.

### PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE

Antígenos Bacterianos: Prontos para utilização.

Controlos: Prontos para utilização. Agitar suavemente os reagentes antes de usar.

**Indicadores de deterioração dos reagentes:** Presença de partículas e agregados. Todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade indicado no recipiente. Quando os frascos são mantidos bem fechados, a 2-8°C, protegidos da luz e se evita a contaminação durante a sua utilização. Não congelar.

### MATERIAL ADICIONAL

- Agitador rotativo de velocidade regulável a 80-100 r.p.m. - Estufa a 37°C - Agitador vortex. - Pipetas de 50 µL.

### AMOSTRAS

Soro fresco. Estável 8 dias a 2-8°C ou 3 meses a -20°C.

As amostras com restos de fibrina devem ser centrifugadas antes do teste. Não utilizar amostras altamente hemolizadas ou lipémicas.

### PROCEDIMENTO

#### A. Método de agglutinação em porta (qualitativo)

- Deixar que os reagentes e as amostras atinjam a temperatura ambiente. A sensibilidade do ensaio diminui a baixas temperaturas.
- Depositar 50 µL da amostra a testar (Nota 1 e 2) e 1 gota (50 µL) de cada controlo em círculos separados de uma porta.
- Misturar o reagente vigorosamente ou com o agitador vortex antes do teste. Adicionar uma gota (50 µL) de antígeno próximo da amostra a testar.
- Misturar com a ajuda de um palito, procurando estender a mistura por toda a superfície interior do círculo.
- Situar a porta sobre um agitador rotativo a 80-100 r.p.m., durante 1 minuto.

#### B. Método de agglutinação em porta (titulação)

- Utilizando uma micropipeta, dispensar 80, 40, 20, 10 e 5 µL de amostra não diluída em círculos separados de uma porta.
- Depositar uma gota (50 µL) de antígeno em cada círculo, próximo da amostra a testar.
- Misturar com a ajuda de um palito, procurando estender a mistura por toda a superfície interior do círculo.
- Situar a porta sobre um agitador rotativo a 80-100 r.p.m., durante 1 minuto.

#### C. Método de agglutinação em tubo tubo (semi-quantificação)

- Preparar uma série de tubos tal como se segue:

Diluições	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	...
Amostra (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 descartar

- Preparar mais 2 tubos para Controlo Positivo e Negativo: 0,1 mL Controlo + 0,9 mL NaCl 9 g/L.
- Adicionar uma gota (50 µL) de antígeno a cada tubo.
- Agitar e incubar os tubos a 37°C durante 24 h (Nota 3).

### LEITURA E INTERPRETAÇÃO (Nota 4)

#### Método de agglutinação em porta

Examinar macroscopicamente a presença ou ausência de agglutinação imediatamente depois de retirar a porta do agitador e comparar os resultados com os soros controlo.

Os resultados obtidos com o **método de titulação em porta**, são aproximadamente equivalentes aos que se obteriam com o método de agglutinação em tubo com diluições do soro de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 respectivamente. Qualquer resultado positivo, é aconselhável a confirmação do título mediante o método de agglutinação em tubo.

#### Método de agglutinação em tubo

Examinar macroscopicamente o modelo de agglutinação (Nota 5) e comparar os resultados com os obtidos nos tubos controlo. O controlo positivo deve mostrar agglutinação parcial ou completa. O controlo negativo não deve mostrar nenhum tipo de agglutinação. Considera-se como resultado positivo qualquer grau de agglutinação parcial ou completa, com diversos graus de clarificação do sobrenadante. O título da amostra define-se como a diluição maior que dá resultado positivo.

### CONTROLO DE QUALIDADE

Recomenda-se utilizar o controlo positivo e negativo para controlar a funcionalidade dos reagentes, assim como para modelo de comparação para a interpretação de resultados. Qualquer resultado distinto do controlo negativo será considerado como positivo.

### VALORES DE REFERÊNCIA

São geralmente indicativos de infecção recente: *Salmonellas*: Títulos  $\geq 1/80$  (anticorps somáticos) e  $\geq 1/160$  (anticorps flagelares). *Brucellas*: Títulos  $\geq 1/80$ . *Proteus*: Uma elevada proporção de indivíduos normais dá resultados positivos com antígenos de Proteus, especialmente no ensaio de agglutinação em porta. Um título inferior a 1/160 no tubo, não deve considerarse significativo. O nível normal de anticorpos febris varia amplemente conforme os diferentes países e comunidades. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

### CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Todas as características diagnósticas dos distintos reagentes de Antígenos Bacterianos podem encontrar-se nos correspondentes Relatórios Técnicos que estão à disposição do utilizador que os solicite.

### INTERFERÊNCIAS

Bilirrubina (20 mg/dL), hemoglobina (10 g/L), lipídios (10 g/L) e factores reumatoides (300 UI/mL), não interferem.

### LIMITAÇÕES DO METODO

- A infecção recente, a imunodépressão, e efeito prozona (Brucelose) e a terapêutica com antibióticos (sômáticos), podem ocasionar falsas negatividades.
- Foram descritas reacções cruzadas com *Brucella* em casos de infecção ou vacinação com algumas estirpes de *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus OX19* e *Y. enterocolitica* (serotipo 9).

### NOTAS

- Nos testes de anticorpos anti-*Brucella*, recomenda-se reduzir a amostra a 20 µL para evitar o efeito prozona.
- Em determinadas áreas geográficas, com elevada prevalência de doenças febris, se recomenda-se a diluição da amostra 1/4 com NaCl 9 g/L antes de realizar o ensaio em porta.
- Pode-se acelerar os tempos de incubação do seguinte modo:
  - Antígenos somáticos (O) e Proteus: 48-50°C, 4 h.
  - Antígenos flagelares (H): 48-50°C, 2 h.
- Um resultado positivo isolado é menos significativo do que uma variação de títulos obtidos nos testes realizados a diferentes intervallos de tempo. O diagnóstico clínico não deve realizar-se unicamente com os resultados do laboratório, mas deve considerarse simultaneamente os dados clínicos do paciente.
- A agglutinação somática caracteriza-se por ser fina e granular, de formação lenta e dificilmente desagregável. A agglutinação flagelar é algodonosa, de formação rápida e facilmente desagregável.

### BIBLIOGRAFIA

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