

ANTIGENOS FEBRILES: PORTA

DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y SEMICUANTITATIVA

Para diagnóstico "in vitro"



Principio

Los Antígenos Febriles son suspensiones bacterianas especialmente preparadas para realizar la seroaglutinación en porta, con el fin de detectar la presencia de aglutininas relacionadas con Brucellosis y Salmonellosis.

Reactivos

S. Typhi H (Ag. flagelar, d-H)	5 ml	Ref. 99 01 88
S. Typhi O (Ag. somático, 9, 12-O)	5 ml	Ref. 99 81 01
S. Paratyphi A H (Ag. flagelar, a-H)	5 ml	Ref. 99 99 17
S. Paratyphi B H (Ag. flagelar, b-H)	5 ml	Ref. 99 08 70
Brucella Abortus	5 ml	Ref. 99 90 01
Brucella Melitensis	5 ml	Ref. 99 82 79
Proteus OX 19	5 ml	Ref. 99 61 15

Controles

Control Positivo Salmonella	1 ml	Ref. 99 91 29
Control Positivo Brucella	1 ml	Ref. 99 46 11
Control Positivo Proteus	1 ml	Ref. 99 91 31
Control Negativo	1 ml	Ref. 99 39 10

Conservación y estabilidad

Los reactivos mantenidos a 2 - 8° C, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No congelar.

Muestra

Suero. Puede conservarse a 2 - 8° C durante una semana.

Precauciones

Los antígenos flagelares contienen 0,5% de formol y los antígenos somáticos 0,5% de fenol para su estabilización, por ello deben manipularse con la debida precaución. La eliminación de los residuos debe hacerse según la normativa legal vigente.

A. Aglutinación en porta. Determinación rápida. Interpretación de los resultados:

Técnica
1.- Llevar los reactivos, muestras séricas y controles a temperatura ambiente.
2.- Homogeneizar la suspensión bacteriana con suavidad, incluso el volumen contenido en la pipeta del cuentagotas.
3.- Dispensar 20 µl de suero y controles en los círculos de reacción. Añadir a cada uno, una gota de la correspondiente solución bacteriana.
4.- Mezclar con la ayuda de un agitador desechable, balancear por espacio de 1 minuto y observar la presencia o ausencia de aglutinación.
Resultados
POSITIVO: Aglutinación. Equivale aproximadamente a un título de 1:80 de la prueba de aglutinación en tubo.
NEGATIVO: No aglutinación. Título inferior a 1:80.

B. Aglutinación en porta. Determinación semicuantitativa

Técnica
1.- Llevar los reactivos, muestras séricas y controles temperatura ambiente.
2.- Homogeneizar la suspensión bacteriana con suavidad, incluso el volumen contenido en la pipeta del cuentagotas.
3.- Dispensar 80, 40, 20, 10 y 5 µl de suero en cada uno de los círculos de reacción. Añadir a cada uno una gota de la suspensión bacteriana.
4.- Mezclar con ayuda de un agitador desechable, balancear con suavidad por espacio de 1 min. y observar la presencia o ausencia de aglutinación.
Resultados
Los volúmenes de suero usados corresponden aproximadamente a títulos 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 en la prueba de aglutinación en tubo.
POSITIVO: Aglutinación.
NEGATIVO: No aglutinación.

Interpretación de los resultados

Son probablemente significativos los títulos iguales o superiores a 1:80. El diagnóstico preciso de la enfermedad depende de la evaluación de los datos clínicos junto con los resultados analíticos. El título aumenta considerablemente entre la fase aguda y la convalecencia.

Prestaciones del producto y características de funcionamiento

La reactividad de los antígenos se ha establecido mediante un suero control de título conocido para cada uno de ellos, al no existir un material de referencia que permita determinar la sensibilidad del producto.

Interferencias: No se detectan interferencias por FR hasta concentraciones de 300 UI/ml. La presencia de Hemoglobina (≤10 g/L), Lípidos (≤10 g/L) o Bilirrubina (≤20 mg/dl) no interfiere en el test.

Restos de detergente en el material pueden ocasionar reacciones falsamente positivas. También el empleo de una disolución salina vieja o contaminada.

QUIMICA CLINICA APLICADA S.A.
Empresa Certificada ISO 9001 / ISO 13485
 A7 Km 1081 – P.O. Box 20 - E43870 AMPOSTA / SPAIN
 Tel. ++ 34 (977) 70. 62. 30 Fax ++ 34 (977) 70. 30. 40
Revisión: Octubre 2011

PRO4_REG9_AFPORTA



FEBRILE ANTIGENS: SLIDE

QUALITATIVE AND SEMIQUANTITATIVE DETERMINATION

For "in vitro" diagnostic



Principle

Febrile antigens are bacterial suspensions specially prepared for use in slide agglutination procedure for detecting specific agglutinins implicated in certain febrile diseases such as Brucellosis and Salmonellosis.

Reagents

S. Typhi H (FlagellarAg., d-H).)	5 ml	Ref. 99 01 88
S. Typhi O (Somatic Ag., 9, 12-O)	5 ml	Ref. 99 81 01
S. Paratyphi A H (Flagellar Ag., a-H)	5 ml	Ref. 99 99 17
S. Paratyphi B H (Flagellar Ag, b-H.)	5 ml	Ref. 99 08 70
Brucella Abortus	5 ml	Ref. 99 90 01
Brucella Melitensis	5 ml	Ref. 99 82 79
Proteus OX 19	5 ml	Ref. 99 61 15

Controls

Salmonella Positive Control	1 ml	Ref. 99 91 29
Brucella Positive Control	1 ml	Ref. 99 46 11
Proteus Positive Control	1 ml	Ref. 99 91 31
Negative Control	1 ml	Ref. 99 39 10

Storage and stability

When stored at 2 - 8° C, the reagents will remain stable until the expiration date stated on the label.

Caution

Somatic antigens contain 0,5% phenol and flagellar antigens contain 0,5% formalin as preservatives.; they should be handled with care
 Waste products must be handled as per local regulations

Sample

Serum. Can be stored up to 1 week at 2 - 8° C.

A. Slide agglutination. Screening test

Procedure
1.- Bring sample, reagent and controls to room temperature.
2.- Softly homogenize the bacterial suspension including the volume in the dropper.
3.- Dispense 20 µl of serum and each control on different zones of the slide. Add one drop of the bacterial suspension to each zone and mix with the aid of a disposable stirrer.
4.- Tilt during 1 min. and observe with the aid of a proper light, for the presence or absence of agglutination.
Results
POSITIVO: Agglutination. Equivalent to a titre of 1:80 (aprox) by the Tube technique.
NEGATIVO: No agglutination. Titre lower than 1:80.

B. Slide agglutination. Semicuantitative determination

Procedure
1.- Bring sample, reagent and controls to room temperature.
2.- Softly homogenize the bacterial suspension including the volume in the dropper.
3.- Dispense 80, 40, 20, 10 and 5 µl of serum and each control on different zones of the slide. Add one drop of the bacterial suspension to each zone and mix with the aid of a disposable stirrer.
4.- Tilt during 1 min and observe with the aid of a proper light, for the presence or absence of agglutination.
Results
The serum volumes dispensed above correspond approximately to titres of 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 and 1:320 by the Tube technique.
POSITIVO: Agglutination.
NEGATIVO: No agglutination.

Interpretation of results

Titres equal or higher than 1:80 have probable diagnostic significance. However, the precise diagnosis of the disease depends not only on the analytical results but also on a whole clinical evaluation. Titre rises considerably between the acute phase and the convalescence.

Performance characteristics

The antigenicity of all febrile antigens have been standardized with control antiserum of established titer

Interferences: There is no interference by RF at titers lower than 300 IU/ml. Hemoglobin (≤10 g/L/L); Lipids (≤10 g/L) or Bilirubin (≤20 mg/dl) do not interfere the test

Traces of detergent in the labware may give falsely positive results, as well as the use of an old or contaminated saline solution.

QUIMICA CLINICA APLICADA S.A.
ISO 9001 / ISO 13485 Certified Company
 A7 Km 1081 – P.O. Box 20 - E43870 AMPOSTA / SPAIN
 Tel. ++ 34 (977) 70. 62. 30 Fax ++ 34 (977) 70. 30. 40
Revision: October 2011

Negative results can be obtained with patients at the early stages of the disease or with those under antibiotic treatment.

In some cases, prozone phenomena can be found; thus, when suspecting a high titre, it is advisable to dilute the sample to 1:20 with physiological saline (NaCl 0.9 %) and perform the test once again.

Quality control

It is recommended that positive and negative controls be run with the samples to be processed to check the right performance of the test.

C.- Tube agglutination. Quantitative determination

It is recommended to confirm each positive reaction by the **Tube technique**.

The test can be done with the same reagents used for slide test as it is stated on the following method

Procedure	Reading
For each antigen prepare, as indicated in the following scheme 7 Kahn tubes and place them in a rack.	Using a proper lamp and reading against a black background, record the degree of agglutination as indicated:
Tube Nº. 1 2 3 4 5 6 7	++++ 100% of the microorganisms are agglutinated. Supernatant is clear.
Saline ml 1,9 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0	
Serum ml 0,1 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0	+++ Approximately 75% of the microorganisms are agglutinated. Supernatant is clear
Antigen µl 50 50 50 50 50 50 50	++ Aproximately 50% of the microorganisms are agglutinated. Supernatant is moderately cloudy.
Título 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280	+ Approximately 25% of the microorganisms are agglutinated. Supernatant is cloudy.
1.- Pipette 1.9 ml of saline into the first tube of each row and 1.0 ml into the remaining tubes.	- No agglutination. Microorganisms remain as a cloudy suspension.
2.- Add 0.1 ml of the serum to be assayed into the first tube, mix well, and transfer 1.0 ml to the second tube.	
3.- Mix well and transfer again 1.0 ml from tube Nr.2 to tube Nr.3 and so on. Discard 1.0 ml from tube Nr.7 after mixing thoroughly.	
4.- Add 50 µl of the desired antigen to each of the 7 tubes shake the rack and incubate at 37° C for 24/48 h.	

Materials required but not provided

For A and B methods
 Glass or plastic slides
 Disposable stirrers

For C method:
 Khan tubes
 Thermostated water bath or similar at 37°C

For all methods
 Pipettes
 Saline solution (NaCl 0.95)

NOTE

The tone and colour intensity of the antigen suspension can vary from lot to lot. This variation will not affect the final results.

Quantitative determination

QCA has also available the following reagents, diluted and ready for use:

S. Typhi H (Ag flagelar, d-H)	90 ml	Ref. 99 63 92
S. Typhi O (Ag somático, 9,12-O)	90 ml	Ref. 99 90 19
S. Paratyphi A H (Ag flagelar,a -H)	90 ml	Ref. 99 17 93
S. Paratyphi B H (Ag Flagelar, b-H)	90 ml	Ref. 99 55 76
Brucella	90 ml	Ref. 99 01 42

References

Vogel,H., Cherubin, C.E., Milian, S.J. (1970). Amer. J. Clin. Pathol., 53, 932 – 938.

PRO4_REG9_AFPORTA



ANTIGÈNES FÉBRILES: LAME

DÉTERMINATION QUALITATIVE ET SEMI-QUANTITATIVE

Pour le diagnostic in vitro

Principe

Les antigènes fébriles sont des suspensions bactériennes spécialement préparées pour effectuer la séro-agglutination sur lame afin de détecter la présence d'agglutinines associées à la brucellose et à la salmonellose.

Réactifs

S. Typhi H (antigène flagellaire, d-H)	5 ml	Réf. 99 01 88
S. Typhi O (antigène somatique, 9, 12-O)	5 ml	Réf. 99 81 01
S. Paratyphi AH (antigène flagellaire, a-H)	5 ml	Réf. 99 99 17
S. Paratyphi BH (antigène flagellaire, b-H)	5 ml	Réf. 99 08 70
Brucella Abortus	5 ml	Réf. 99 90 01
Brucella Melitensis	5 ml	Réf. 99 82 79
Proteus OX19	5 ml	Réf. 99 61 15

Contrôles

Contrôle positif Salmonella	1 ml	Réf. 99 91 29
Contrôle positif Brucella	1 ml	Réf. 99 46 11
Contrôle positif Proteus	1 ml	Réf. 99 91 31
Contrôle négatif	1 ml	Réf. 99 39 10

Conservation et stabilité

Conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas congeler.

Échantillon

Sérum. Il peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant une semaine.

Précautions d'emploi

Pour garantir leur stabilisation, les antigènes flagellaires contiennent 0,5 % de formol et les antigènes somatiques 0,5 % de phénol. Ils doivent par conséquent être manipulés avec précaution.

L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux normes en vigueur.

A. Agglutination sur lame. Détermination rapide

Technique

1. Laisser les réactifs, les échantillons sériques et les contrôles atteindre la température ambiante.
2. Homogénéiser délicatement la suspension réactive ainsi que le volume contenu à l'intérieur de la pipette du compte-gouttes.
3. Déposer 20 µl de sérum et de contrôles sur les cercles de réaction. Ajouter sur chacun d'entre eux une goutte de la solution bactérienne correspondante.
4. Mélanger à l'aide d'un agitateur jetable, agiter pendant une minute puis observer la présence ou l'absence d'agglutination.

Résultats

POSITIF: agglutination. Équivaut à un titre d'environ 1:80 de l'essai d'agglutination en tube.
NÉGATIF: absence d'agglutination. Titre inférieur à 1:80.

B. Agglutination sur lame. Détermination semi-quantitative

Technique

1. Laisser les réactifs, les échantillons sériques et les contrôles atteindre la température ambiante.
2. Homogénéiser délicatement la suspension bactérienne voire le volume contenu dans la pipette du compte-gouttes.
3. Déposer 80, 40, 20, 10 et 5 µl de sérum sur chacun des cercles de réaction. Ajouter une goutte de la suspension bactérienne sur chaque cercle.
4. Mélanger à l'aide d'un agitateur jetable, agiter délicatement pendant 1 minute puis observer la présence ou l'absence d'agglutination.

Résultats

Les volumes de sérum utilisés correspondent approximativement aux titres 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 et 1:320 lors de l'essai d'agglutination en tube.
POSITIF : agglutination.
NÉGATIF : absence d'agglutination.

Interprétation des résultats

Les titres égaux ou supérieurs à 1:80 sont probablement significatifs. Le diagnostic précis de la maladie dépend de l'évaluation des données cliniques et des résultats analytiques.

Le titre augmente considérablement entre la phase aiguë et la convalescence.

Fonctionnement et caractéristiques de performance du dispositif

La réactivité des antigènes a été établie au moyen d'un sérum contrôle de titre connu pour chacun d'entre eux, car il n'existe pas de matériel de référence permettant de déterminer la sensibilité du produit.

Interférences: aucune interférence due à la présence de facteurs rhumatoïdes n'a été observée jusqu'à des concentrations de 300 UI/ml. La présence d'hémoglobine (≤ 10 g/l), de lipides (≤ 10 g/l) ou de bilirubine (≤ 20 mg/dl) n'interfère pas avec l'essai. Des restes de détergent sur le matériel peuvent produire des réactions faussement positives, ainsi que l'emploi d'une solution saline ancienne ou contaminée.

On peut observer des faux négatifs au début de la maladie ou chez des patients traités avec des antibiotiques.

Dans certains cas, des phénomènes de prozone peuvent se produire ; si un titre très élevé est suspecté, il est conseillé de diluer l'échantillon 1:20 dans une solution saline (NaCl 0,9 %) et de répéter l'essai.

La contamination des suspensions ou de la solution saline utilisée peut donner des faux positifs.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif avec chaque groupe d'échantillons à analyser afin de vérifier le bon fonctionnement de l'essai.

C.- Agglutination en tube. Détermination quantitative

Toute réaction positive doit être vérifiée par la technique d'agglutination en tube.

Si vous le souhaitez, la détermination peut être effectuée avec les mêmes réactifs concentrés utilisés lors de la détermination sur lame selon la méthode indiquée ci-dessous.

Technique

Pour chaque antigène, disposer comme indiqué sur le tableau ci-joint, une série de 7 tubes de type sérologique (Kahn) sur un porte-tubes.

Tube N°.	1	2	3	4	5	6	7
Saline ml	1,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Sérum ml	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	→	→	→	→	→	→	→
Antigène µl	50	50	50	50	50	50	50
Titre	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280

1. À l'aide d'une pipette, introduire 1,9 ml de solution saline dans le n° 1 et 1,0 ml dans chacun des six tubes suivants.
2. Ajouter 0,1 ml de sérum à analyser dans le tube n° 1. Bien mélanger puis transférer 1,0 ml de cette dilution dans le tube n° 2.
3. Mélanger à nouveau puis transférer 1,0 ml du tube n° 2 dans le tube n° 3. Procéder de la même façon jusqu'au tube n° 7. Rejeter 1,0 ml du tube n° 7.
4. Une fois les dilutions précédentes effectuées, ajouter 50 µl d'antigène dans chaque tube. Bien agiter le porte-tubes puis incubé à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Après la période d'incubation, procéder à la lecture des résultats.

Lecture

À l'aide d'une bonne source lumineuse, examiner les tubes, de préférence sur fond noir.

++++ Agglutination de 100 % des microorganismes. Liquide surnageant limpide.

+++ Agglutination d'environ 75% des microorganismes. Liquide surnageant clair.

++ Agglutination d'environ 50 % des microorganismes. Légère turbidité du liquide surnageant.

+ Agglutination d'environ 25 % des microorganismes. Liquide surnageant trouble.

- Absence d'agglutination. Les microorganismes forment une suspension trouble.

Matériel complémentaire non fourni

Pour les méthodes A et B:
Lames ou plaques en verre pour la réaction d'agglutination.
Bâtonnets jetables.

Pour la méthode C:
Tubes à essai de type Kahn.
Bain thermostaté ou étuve à 37 °C.

En général:
Pipettes de volume variable.
Solution saline (NaCl 0,9 %).

REMARQUES

L'intensité et la tonalité de la couleur de la suspension bactérienne peuvent varier d'un lot à l'autre.

Cette variation n'affecte en aucun cas les résultats.

Essai quantitatif

QCA dispose de réactifs préalablement dilués et ajustés pour effectuer l'essai :

S. Typhi H (Ag flagellaire, d-H)	90 ml	Réf. 99 63 92
S. Typhi O (Ag somatique, 9, 12-O)	90 ml	Réf. 99 90 19
S. Paratyphi AH (Ag flagellaire, a-H)	90 ml	Réf. 99 17 93
S. Paratyphi BH (Ag flagellaire, b-H)	90 ml	Réf. 99 55 76
Brucella	90 ml	Réf. 99 01 42

Bibliographie

Vogel, H., Cherubin, C.E., Milian, S.J. (1970). Amer. J. Clin. Pathol., 53: 932-938.