

Para uso Profesional de Diagnóstico.

INDICACIONES DE USO

Antígenos para aglutinación macroscópica en placa o tubo para el diagnóstico serológico en procesos infecciosos producidos por microorganismos de los géneros: *Salmonella* y *Brucella*.

DESCRIPCION

La aglutinación se puede realizar en placa o en tubo; las pruebas en placas son rápidas y se utilizan en caso de detecciones preliminares para establecer la presencia o ausencia de anticuerpos homólogos; si en el anticuerpo está presente en una muestra de suero y se quiere cuantificar los títulos de anticuerpos, entonces la prueba en tubo es la indicada.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Antígeno Tífico "O" (Antígeno *Salmonella* D grupo D). 5 ml en frasco de borosilicato con gotero.
2. Antígeno Tífico "H" (Antígeno *Salmonella* H grupo D). 5 ml en frasco de borosilicato con gotero.
3. Antígeno Paratífico "A" (Antígeno *Salmonella* H grupo A). 5 ml en frasco de borosilicato con gotero.
4. Antígeno Paratífico "B" (Antígeno *Salmonella* H grupo B). 5 ml en frasco de borosilicato con gotero.
5. Antígeno *Brucella abortus*. 5 ml en frasco de borosilicato con gotero.
6. Antígeno *Proteus OX19*. 5 ml en frasco de borosilicato con gotero.

CONSERVADORES

Brucella abortus, *Salmonella* Somático Grupos D, *Proteus OX19* son conservados con fenol al 1.0%. Los antígenos flagelares incluyendo paratífico A, B; Tífico H son conservados con Formalina al 1.0%.

MATERIAL REQUERIDO, PERO NO SUMINISTRADO

1. Placa de vidrio con concavidades o anillos.
2. Pipetas para suero.
3. Aplicadores.
4. Tubos de prueba.
5. Solución de Cloruro de sodio al 0.9%.
6. Rotador mecánico (opcional).
7. Control positivo.
8. Control negativo.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

No congelar. Mantener a temperaturas de entre 2°C – 8°C. La fecha de expiración se indica en la parte externa de este producto. Una indicación biológica de inestabilidad del producto se hace evidente por reacción inadecuada del látex con los sueros controles.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso de diagnóstico *In Vitro*.
2. No utilice el producto después de su fecha de expiración.
3. El suero debe ser claro y no calentarse cuando se utilice.
4. Para maximizar la interpretación de la prueba se deben incluir los sueros controles Positivo, Negativo y Salino.
5. Todos los sueros que se van a examinar deben estar claros y libres de contaminación bacteriana.
6. No calentar el suero antes de realizar la prueba.
7. Agitar bien el antígeno antes de usarse para asegurar la obtención de una suspensión suave y uniforme.
8. El antígeno deberá ser almacenado en refrigeración 2°- 8° C cuando no sea utilizado.
9. El antígeno no deberá congelarse.

MÉTODO DE PRUEBA RÁPIDA EN PLACA

1. Llevar todos los reactivos y muestras séricas a temperatura ambiente. Obtener una placa de vidrio clara y transparente y dividirla en cuadrados de 3.8 cm con el lápiz de cera o de punta de diamante (puede utilizar un cuadro de vidrio), o bien utilizar la placa para aglutinación.
2. Utilizando una pipeta, agregar el suero que va a ser probado de izquierda a derecha, a los cuadros o anillos consecutivos en las cantidades siguientes: 0.08ml; 0.04 ml; 0.02 ml; 0.01 ml; 0.005 ml; el suero deberá estar claro y sin calentar; repita el procedimiento con los controles.
3. Agitar suavemente el antígeno hasta asegurar una suspensión uniforme.
4. Agregar un agota de la suspensión del antígeno en cada una de las cantidades de suero. Mezclar el suero y el antígeno usando el aplicador o palillo.
5. Usar aplicadores separados para cada cantidad de suero o usar el mismo aplicador procediendo de derecha a izquierda.
6. Rotar la placa en forma mecánica o manualmente a 150 rpm por 2 o 3 minutos (En el caso del *Proteus OX19* de 4 a 5 minutos).
7. Observar si hay aglutinación usando una buena luz indirecta contra un fondo oscuro.
8. Los controladores a utilizar deberán ser un suero positivo de título conocido y un suero negativo.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El grado de aglutinación es registrado en la forma siguiente:

- 4+ -100% de los organismos son aglutinados.
- 3+ -75% de los organismos son aglutinados.
- 2+ -50% de los organismos son aglutinados.
- 1+ -25% de los organismos son aglutinados.
- +/- -menos del 25% de los organismos son aglutinados.

NEGATIVO: No se observó aglutinación.

Aunque la prueba en placa no se recomienda para titulación, la cantidad de suero que da 50% de aglutinación, puede ser utilizada para establecer el título aproximado del suero. Las diluciones del suero en placa son aproximadamente equivalentes a las pruebas en tubo como se muestra a continuación:

Vol. suero en ml:	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
	Dilución aproximada				
En el tubo:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320

MÉTODO DE PRUEBA RÁPIDA DE TITULACION EN TUBO DE ENSAYO

Coloque diez tubos de ensayo de 12x75 mm (o 13x100 mm) en una gradilla.

1. Agregue 1.9 ml de solución de cloruro de sodio al 9% en el primer tubo.
2. Agregue 1.0 ml de solución de cloruro de sodio al 9% en el resto de los tubos.
3. Agregue 0.1 del suero a evaluar en el primer tubo. Mezcle bien y transfiera 1.0 del suero diluido del primer tubo al segundo tubo. Mezcle bien y transfiera 1.0 del suero diluido del segundo tubo al tercero. Repita este procedimiento sucesivamente hasta completar los diez tubos que contiene solución diluida desde 1:20 hasta 1:10,240. quite 0.5ml de suero diluido del tubo 10 y deséchelo. El tubo 1 es considerado con una dilución 1:20 ya que 0.5ml. del antígeno es añadido a 0.5ml de la dilución 1:10. repita este procedimiento con los sueros controles positivo y negativo.

- Coloque un tubo al final de la serie de los tubos de dilución y añada 1.0ml. de la solución de cloruro de sodio al 0.9% usada para diluir el suero.
- Mezcle la suspensión de antígeno agitando vigorosamente el vial. Agregue una gota del antígeno a evaluar (0.5ml) a cada tubo.
- Mezcle bien agitando la gradilla con los tubos y coloque la incubación en baño maría. Los tiempos y temperatura de incubación son los siguientes:

Antígenos	Temperatura	Tiempo de incubación (hrs.)
Salmonella "O" Grupo D	45°-50°C	2
Salmonella "H" A	45°-50°C	2
Salmonella "H" B	45°-50°C	2
Salmonella "H" D	45°-50°C	2
<i>Brucella abortus</i>	37°C	48
Proteus OX19	45°-50°C	18

Nota: Tífico H y los antígenos Salmonella flagelar deben ser incubados por dos horas a una temperatura de entre 45°- 50°C seguidos por 18 horas de reposo a temperatura de 2°-8°C antes de usar la lectura final.

- Después de la incubación quite cuidadosamente la gradilla de los tubos de ensayo y observe el grado de aglutinación. Utilice luz indirecta contra un fondo oscuro para obtener condiciones óptimas para la lectura de los tubos.
- Registre los resultados de la siguiente manera:

RESULTADOS POSITIVOS

4+ 100% de los organismos se encuentran sedimentados en el fondo del tubo y los fluidos sobre nadantes son claros.

3+ Aproximadamente 75% de los organismos se encuentran sedimentados y los fluidos sobre nadantes son ligeramente opacos.

2+ Aproximadamente 50% de los organismos se encuentran sedimentados y los fluidos sobre nadantes son moderadamente opacos.

1+ Aproximadamente el 25% de los organismos sedimentados los fluidos sobre nadantes son opacos.

RESULTADOS NEGATIVOS

No se observa ninguna aglutinación y la suspensión aparece turbia.

Registre el título del suero reactivo que en la última dilución dé como resultado un 2+.

CONTROL DE CALIDAD

El uso de los controles positivo y negativo en el suero de prueba en paralelo a una muestra de prueba de suero desconocida, es recomendado para asegurar al químico que el antígeno bacteriano utilizado es capaz de reaccionar con su anticuerpo homólogo y demostrar que los resultados son los esperados. El suero control positivo tiene un título de 1:80 o más de antígeno homólogo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Las aglutininas no son siempre producidas por infecciones bacterianas.
- Pueden ocurrir reacciones cruzadas en ciertas enfermedades. Por ejemplo, la tularemia puede producir aglutinaciones al antígeno de *Brucella*.
- Las vacunas para varias enfermedades pueden producir aglutininas de reacciones cruzadas. La vacuna contra el tifo puede producir anticuerpos a antígenos de *Proteus*.

NOTA: La seguridad diagnóstica de la enfermedad depende de una relación estrecha de trabajo entre el laboratorio clínico y el médico. Una elevación en los títulos del anticuerpo en las muestras de suero, entre la fase aguda y la fase convaleciente acompañada en los signos y síntomas más frecuentes son la mejor base para llevar a cabo un diagnóstico exacto.

VALORES ESPERADOS

Cuando las bacterias viables son introducidas dentro de un huésped susceptible, ocurre una respuesta inmune que es capaz de producir anticuerpos llamados aglutinas. Estas aglutinas son capaces de reaccionar específicamente con suspensiones de especies de Salmonella responsables de la infección, provocando que se aglutinen. Las aglutininas son producidas despacio durante la fase aguda y continúan durante la fase de convalecencia de la infección. La concentración del anticuerpo aumenta considerablemente entre la infección aguda y la convalecencia, por lo que la elevación de la concentración del suero evaluado durante la etapa febril aguda de la infección y la etapa de convalecencia puede tener significancia en el diagnóstico. La siguiente tabla indica los títulos de aglutininas normalmente esperados durante la infección con varias especies bacterianas.

TABLA

- Antígeno febril usado en la prueba para la aglutinina.
- Semanas para la aparición de anticuerpos.
- (Semanas) aparición de título pico de anticuerpo.
- Título significativo.

Enfermedad		1	2	3	4
Brucelosis	<i>Brucella abortus</i>		2-3	3-5	1:80 o mayor
Fiebre Paratifoidea	Salmonella Flagelar A		2-3	4-5	1:80
Fiebre Paratifoidea	Salmonella Flagelar B		2-3	4-5	1:80
Fiebre de las montañas	Proteus OX19		1-2	2-3	1:160
Tularemia	<i>Francisella Tularensis</i>		2	4-8	1:160
Fiebre Tifoidea	Salmonella Flagelar D		2-3	4-5	1:80
Fiebre Tifoidea	Salmonella Grupo D		1-2	3-5	1:80

Nota: Significativo en individuos no vacunados.

REFERENCIAS

- Dyer, RE., *JAMA.*, 124; 1165, 1944
- Felix, A: *Brit. Md.J.* 11:597, 1942
- Spink, W.W.: *Amer J. Clin. Path.*, 22:201, 1952
- Welch, H. & Stuart, C.A.: *J Lab. Clin.Med.*, 21:411, 1936