

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 *Rickettsia* 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 an 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  $\mu$ L.

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)

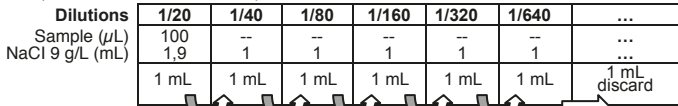
- Bring the reagents and samples to room temperature. The sensitivity of the test may be reduced at low temperatures.
- Place 50  $\mu$ L of the sample to be tested (Note 1 and 2) and 1 drop of each control into separate circles on the slide test.
- Mix the antigen well vigorously or on a vortex mixer before using. Add 1 drop (50  $\mu$ L) 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  $\mu$ L of undiluted serum into separate circles of the slide test.
- Place 1 drop (50  $\mu$ L) 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:



- Prepare 2 tubes for Positive and Negative control: 0.1 mL Control + 0.9 mL NaCl 9 g/L.
- Add a drop (50  $\mu$ L) of antigen suspension to each tube.
- 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  $\geq$  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  $\mu$ L 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, flocculent 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.

Якісне визначення фебрильних антитіл IVD

Зберігати при температурі 2-8°C.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Тест на аглютинацію бактеріальних антигенів на предметних скельцях для якісного та напівкількісного виявлення антитіл до салмонел, бруцел та деяких рикетсій у сироватці крові людини. Реагенти, стандартизовані суспензії вбитих і забарвлених бактерій, проявляють аглютинацію при змішуванні зі зразками, які містять гомологічні антитіла.

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Діагностика фебрильних захворювань може бути оцінена або шляхом виділення мікроорганізмів у крові, випорожнень або сечі, або шляхом титрування специфічних антитіл, соматичних (O) і джгутикових (H). Виявлення цих антитіл лежить в основі тесту Відаля. Цей тест показує, що сироватка з високим рівнем аглютинуючих антитіл до O і H > 1/100 свідчить про інфікування цими мікроорганізмами.

РЕАКТИВИ

РЕАКТИВ	Антиген	Кат.номер	Фасування	
<i>Salmonella paratyphi AH</i>	a джгутиковий	1205011	5 мл	
<i>Salmonella paratyphi AO</i>	1,2,12, соматичний	1205021		
<i>Salmonella paratyphi BH</i>	b джгутиковий	1205031		
<i>Salmonella paratyphi BO</i>	1,4,5,12 соматичний	1205041		
<i>Salmonella paratyphi CH</i>	c джгутиковий	1205051		
<i>Salmonella paratyphi CO</i>	6,7 соматичний	1205061		
<i>Salmonella typhi H</i>	d джгутиковий	1205071		
<i>Salmonella typhi O</i>	1,9,12 соматичний	1205081		
<i>Brucella abortus</i> *	соматичний	1205091		
<i>Brucella melitensis</i>	соматичний	1205097		
<i>Proteus OX2</i>	соматичний	1205101		
<i>Proteus OX19</i>	соматичний	1205111		
<i>Proteus OXK</i>	соматичний	1205121		
Control +		1205201		1 мл
Control -		1205211		
Набір бактеріальних антигенів		1205006		4 x 5 мл
		1205008	8 x 5 мл - 2 x 1 мл	
		1205010	6 x 5 мл - 2 x 1 мл	

(\*): Застосовується також для виявлення антитіл до *Brucella suis*.

Різні корелятивні літери посилення відповідають різним змінам презентації.

СКЛАД РЕАГЕНТІВ

- *Бактеріальні антигени*: Суспензії салмонел, бруцел та протею в гліциновому буфері, pH 8.2. Консервант.

- Контроль: Сироватка крові тварин. Консервант

КАЛІБРУВАННЯ

Не існує жодного міжнародного стандарту для стандартизації чутливості цих реагентів. З цієї причини Spinreact використовує внутрішній контроль, який містить сироватку тварин з антитілами проти салмонел, бруцел і протею, і титрується комерційними реагентами сертифікованої якості.

ПІДГОТОВКА ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Суспензії антигенів: Готові до використання.

Контроль: Готовий до використання. Перед використанням обережно перемішати реагенти.

Сушіння реагентів: Наявність частинок і згустків.

Всі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці, при зберіганні при температурі 2-8°C, в захищеному від світла та забруднень місці. Не заморозувати.

ДОДАТКОВЕ ОБЛАДНАННЯ

- Механічний ротатор, що регулюється на 80-100 об/х. - Нагрівач на 37°C. - Вортекс. - Плетки 50 мл.

ЗРАЗКИ

Свіжа сироватка. Стабільна 8 днів при 2-8°C або 3 місяці при -20°C.

Зразки з наявністю фібрину слід центрифугувати перед тестуванням. Не використовуйте сильно гемолізовані або ліпомічні зразки.

ПРОЦЕДУРА

A. Метод аглютинації на предметних стеклах (якісний тест)

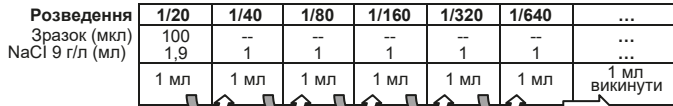
- Доведіть реагенти та зразки до кімнатної температури. Чутливість тесту може бути знижена при низьких температурах.
- Нанесіть 50  $\mu$ L досліджуваного зразка (Примітка 1 і 2) і по 1 краплі кожного контролю в окремі кола на предм. скляку.
- Перед використанням перемішайте флакон з антигеном енергійно або міксері. Додайте по 1 краплі (50  $\mu$ L) антигену в кожне коло поруч зі зразком, який тестується.
- Перемішайте одноразовою лопаткою і розподіліть по всій площі, охолодженій колом.
- Помістіть предметне скло на механічний ротатор зі швидкістю 80-100 об/х на 1 хвилину.

B. Метод аглютинації на предметному склі (титрування)

- За допомогою мікроплетки внесіть 80, 40, 20, 10 і 5  $\mu$ L нерозведеної сироватки в окремі кола предм. скла.
- Нанесіть по 1 краплі (50  $\mu$ L) антигену в кожне коло поруч зі зразком, який тестується.
- Перемішайте одноразовою лопаткою і розподіліть по всій площі, охолодженій колом.
- Помістіть предметне скло на механічний ротатор зі швидкістю 80-100 об/х на 1 хвилину.

C. Метод аглютинації в пробірках

- Підготуйте ряд пробірок для кожного зразка наступним чином:



- Приготуйте 2 пробірки для позитивного і негативного контролю: 0,1 мл контролю + 0,9 мл NaCl 9 г/л.
- Внесіть краплю (50  $\mu$ L) суспензії антигену в кожную пробірку.
- Ретельно перемішайте та інкубуйте пробірку з тестом при 37°C протягом 24 годин (Примітка 3).

ЗЧИТУВАННЯ ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ (Примітка 4)

Метод аглютинації на предметному склі

Перевірте макроскопічним методом наявність або відсутність згустків протягом 1 хвилини після вимийання предметного скла з ротатора, порівнюючи результати тесту з контрольними сироватками.

Реакції, отримані методом титрування на предметному склі, приблизно еквівалентні реакціям, які відбуваються в пробірках з розведенням сироватки 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 і 1/320 відповідно. Якщо реакція виявлена, рекомендується підтвердити її і встановити титр за допомогою тесту в пробірці.

Тест на аглютинацію в пробірках

Макроскопічно вивчіть картину аглютинації (Примітка 5) і порівняйте результати з результатами всіх контрольних пробірок. Позитивний контроль повинен давати часткову або повну аглютинацію. Негативний контроль не повинен давати видимих грудочок. Часткова або повна аглютинація з різним ступенем очищення надосадової рідини реєструється як позитивна. Титр сироватки визначається як найбільше розведення, що дає позитивний результат.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Позитивний і негативний контроль рекомендується використовувати для моніторингу виконання процедури, а також як порівняльний зразок для кращої інтерпретації результатів. Воє результати, відмінні від негативного контролю, вважатимуться позитивними.

РЕФЕРЕНТНІ ДІАПАЗОНИ

Як правило, вони вказують на нещодавню інфікування: *Salmonella*: титри  $\geq$  1/80 (соматичні антитіла) і  $\geq$  1/160 (джгутикові антитіла), бруцелі: титри  $\geq$  1/80. *Proteus*: Висока частка здорових людей має позитивний результат на антигени *Proteus*, особливо в реакції аглютинації на предметному склі. Титр менше 1/160 у пробірці не слід вважати значущим. Нормальний рівень антитіл до протею в різних країнах і громадах варіює в широких межах. Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила власні референтні значення.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕФЕКТИВНОСТІ

Всі діагностичні характеристики різних реагентів для виявлення бактеріальних антигенів можна знайти у відповідних технічних звітах, які надаються за запитом.

ФАКТОРИ, ЯКІ ВПЛИВАЮТЬ НА ЯКІСТЬ ДОСЛІДЖЕННЯ

Білірубрін (20 мг/дл), гемоглобін (10 г/л), ліпіди (10 г/л) та ревматоїдні фактори (300 МО/мл)

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Нещодавні інфекції, імуносупресія, ефект прозони (бруцельоз) та антибіотикотерапія (соматичні захворювання) можуть спричинити хибнонегативні результати.
- Повідомлялося про перехресні реакції з *Brucella* у випадках інфікування або вакцинації деякими штамми *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Proteus OX19* та *Y. enterocolitica* (серотип 9).

ПРИМІТКИ

- При тестуванні на антитіла до *Brucella* рекомендується зменшити об'єм зразка до 20  $\mu$ L, щоб уникнути прозони.
- У деяких географічних регіонах з високою поширеністю фебрильних антитіл рекомендується розвести зразок на 1/4 в NaCl 9 г/л перед проведенням аналізу.
- Процедура інкубації може бути прискорена наступним чином:
  - Соматичні (O) та протеус антигени: 48-50°C протягом 4 годин.
  - Флагелярні (H) антигени: 48-50°C протягом 2 годин.
- Одиничний позитивний результат має менше значення, ніж демонстрація зростаючої титру антитіл як доказ інфекції. Клінічний діагноз не повинен ставитися на основі одного результату тесту, а повинен інтегрувати клінічні та лабораторні дані.
- Соматична реакція (O) характеризується грубою, компактною аглютинацією, яка, як правило, важко розсіюється, тоді як джгутикова (H) має характерну рихлу, флокулянтну аглютинацію.