



Antígenos Bacterianos

Aglutinación en porta y tubo

Determinación cualitativa de anticuerpos febriles

Brucella Abortus: 101-0060 (20 x 5 mL), 101-0615 (5 mL)
Brucella Mellitensis: 101-0061 (20 x 5 mL), 101-0616 (5 mL)
Salmonella Typhi H (d-H): 101-0062 (20 x 5 mL), 101-0617 (5 mL)
Salmonella Typhi O (1,9,12-O): 101-0063 (20 x 5 mL), 101-0618 (5 mL)
Salmonella Paratyphi AH (a-H): 101-0064 (20 x 5 mL), 101-0619 (5 mL)
Salmonella Paratyphi AO (1,2,12-O): 101-0065 (20 x 5 mL), 101-0630 (5 mL)
Salmonella Paratyphi BH (b-H): 101-0066 (20 x 5 mL), 101-0620 (5 mL)
Salmonella Paratyphi BO (1,4,5,12-O): 101-0067 (20 x 5 mL), 101-0631 (5 mL)
Salmonella Paratyphi CH (c-H): 101-0068 (20 x 5 mL), 101-0632 (5 mL)
Salmonella Paratyphi CO (6,7-O): 101-0069 (20 x 5 mL), 101-0633 (5 mL)
Proteus OX19: 101-0070 (20 x 5 mL), 101-0634 (5 mL)
Proteus OX2: 101-0071 (20 x 5 mL), 101-0636 (5 mL)
Proteus OXK: 101-0072 (20 x 5 mL), 101-0635 (5 mL)
Polivalent Positive Control: 101-0106 (1 x 1 mL)
Polivalent Negative Control: 101-0107 (1 x 1 mL)

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 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
Salmonella paratyphi AH	a flagellar
Salmonella paratyphi AO	1,2,12, somatic
Salmonella paratyphi BH	b flagellar
Salmonella paratyphi BO	1,4,5,12 somatic
Salmonella paratyphi CH	c flagellar
Salmonella paratyphi CO	6,7 somatic
Salmonella typhi H	d flagellar
Salmonella typhi O	1,9,12 somatic
Brucella abortus (*)	somatic
Brucella melitensis	somatic
Proteus OX2	somatic
Proteus OX19	somatic
Proteus OXK	somatic
Control +	
Control -	

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

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 los 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 una 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 (50 µL) 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 generalmente 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 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

1. En los ensayos de anticuerpos anti-Brucella, 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 CINA 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.