

W.W.-DAT**DIESSE****REF 26010**

DIESSE Diagnostica
Senese S.p.A.
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy



	Capitolo Section
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision	11



ISTRUZIONI PER L'USO

W.W.-DAT

Per la determinazione degli anticorpi agglutinanti specifici anti-Salmonella e anti- Brucella

Solo per uso diagnostico in vitro

1. UTILIZZAZIONE

Metodo che utilizza sospensioni colorate di Salmonella e Brucella per la determinazione degli anticorpi agglutinanti specifici nel siero umano.

2. INTRODUZIONE

L'indagine sierologica su pazienti che presentano febbre persistente può aiutare nella diagnosi della febbre tifoidea e della brucellosi. Tecnicamente il test si esegue osservando l'agglutinazione diretta di sospensioni batteriche causata da anticorpi specifici eventualmente presenti nel siero del paziente. Il metodo è noto come reazione di Widal-Wright e consente, testando diluizioni scalari del siero, di effettuare una titolazione semiquantitativa degli anticorpi presenti.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il siero in esame viene fatto reagire con la sospensione batterica a concentrazione ottimizzata per effettuare il test in tecnica semiautomatica sullo strumento AUTO-DAT e/o in slide.

Il titolo viene attribuito con un'elaborazione software dell'immagine dell'agglutinato, che si ottiene in pozzetti di micropiastre, e memorizzato all'interno dello strumento.

Le sospensioni batteriche possono essere utilizzate anche per effettuare il test in slide e/o provetta.

4. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Qualunque materiale di origine biologica deve essere considerato potenzialmente infetto. Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi sia per la ricerca di HBsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero ed i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di leggi vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca.
 2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova.
 3. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
 4. In merito alle caratteristiche di sicurezza dei reagenti contenuti nel kit consultare la Scheda di Sicurezza (disponibile su richiesta).
 5. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata.
- Tutti i materiali utilizzati per decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti.
- Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

Prima dell'uso, portare i dispositivi da utilizzare a temperatura ambiente (18-30°C).

1. Dopo l'uso riporre i reagenti a 2-8°C.
2. Non utilizzare campioni fortemente emolizzati, lipemici, itterici, di siero non completamente coagulato o che presentano inquinamento microbico.
3. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
4. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
5. Non modificare la Procedura.

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono sufficienti per effettuare 100 tests in automazione con AUTO-DAT (700 tests).

I reagenti sono sufficienti per analizzare 60 campioni in slide.

BACTERIAL SUSPENSION SOSPENSIONE BATTERICA 1 x 2.5 mL

delle seguenti sospensioni:

- S. THYPHI O
- S. THYPHI H
- S. PARATHYPHI A O
- S. PARATHYPHI A H
- S. PARATHYPHI B O
- S. PARATHYPHI B H
- BRUCELLA

Contenuto: Sospensione di batteri uccisi e colorati a concentrazione ottimizzata per effettuare il test in slide. Contiene sodio azide 0.09% come conservante.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 1 mL

Contenuto: Siero di controllo positivo polivalente di origine animale contenente sodio azide 0.09% come conservante.

Contiene anticorpi che agglutinano tutte le sospensioni batteriche del kit.

CONTROL - CONTROLLO NEGATIVO

1 x 1 mL

Contenuto: Siero di controllo negativo contenente Proclin e Gentamicina come conservante.

PORTARE I REAGENTI A TEMPERATURA AMBIENTE PRIMA DELL'USO

ALTRO MATERIALE:

- Slides (3)
- Bastoncini per la miscelazione (100)

ALTRO MATERIALE RICHiesto MA NON FORNITO:

- Pipette con puntali disposable
- Soluzione fisiologica
- Micropiastre da 96 pozzetti con fondo piatto, Auto-DAT Microplate **REF** 26005
- Provette monouso per il test in provetta
- Strumento AUTO-DAT (**REF** 26000)

6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

La stabilità dei reagenti non cambia dopo apertura del flacone, purché l'utilizzatore faccia attenzione a mantenere il prodotto al riparo da possibile contaminazione microbica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Siero fresco conservato a 2/8°C per un massimo di 7 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi congelare a -20°C, può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Impiegare subito dopo scongelamento.

8. PROCEDIMENTO

Portare a temperatura ambiente il reattivo ed agitare accuratamente, ma non vigorosamente, il flacone della sospensione batterica.

APPLICAZIONE STRUMENTALE CON AUTO-DAT

Pipettare 25 µL di campione e 25 µL di reattivo in un pozzetto di micropiastre (**REF** 26005). Inserire la micropiastre nello strumento e premere START. Lo strumento, al termine della reazione (che dura circa 15 minuti) stamperà il risultato in titolo.

TEST DI SCREENING

Qualora non sia possibile effettuare il test su AUTO-DAT si possono utilizzare i reagenti per un test di screening. Distribuire 20 µL di siero in esame nel cerchio dello slide. Aggiungere 40 µL di sospensione e mescolare; ruotare lo slide ed osservare dopo un minuto esatto. Si avrà agglutinazione nei campioni positivi mentre con i negativi la sospensione rimarrà omogenea.

TITOLAZIONE IN PROVETTA

Diluire il campione 1:20 con soluzione fisiologica (0.1 mL siero + 1.9 mL fisiologica). Prelevare 1 mL dalla prima provetta e fare delle diluizioni seriali con 1 mL di fisiologica, come riportato nello schema. Aggiungere 40 µL della sospensione ad ogni provetta, agitare ed incubare a 37°C per una notte (vedi schema riportato sotto). Il bianco prova viene effettuato mescolando la sospensione con fisiologica.

Provetta	1	2	3	4	5	6	7
Sol. Fis. mL.	1.9	1	1	1	1	1	1
Siero ml	0.1						
Mescolare e trasferire ml	1	1	1	1	1	1	1
Diluizione/Titolo	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280

9. VALIDAZIONE DEL TEST SU AUTO-DAT

Utilizzando 25 µL del siero di **Controllo Positivo** effettuare il test su AUTO-DAT e confrontare il risultato con i titoli riportati nel certificato di analisi. Sono accettati scostamenti di +/- una diluizione del titolo.

Se il risultato è diverso dall'atteso, contattare il Scientific Support:

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Reazione positiva

Applicazione strumentale con AUTO-DAT: viene stampato il titolo.

Test di screening: presenza di un agglutinato in confronto al controllo negativo

Titolazione in provetta: presenza di un agglutinato di aspetto granulare (antigene O) o fioccoso (antigene H) con sovranatante limpido rispetto al bianco.

Reazione negativa

Applicazione strumentale con AUTO-DAT: viene stampato che il campione è negativo.

Test di screening: assenza di un agglutinato in confronto al controllo negativo. Sospensione omogenea

Titolazione in provetta: assenza di un agglutinato in confronto al controllo negativo. Sospensione omogenea.

Il titolo è dato dalla più alta diluizione in grado di agglutinare i batteri presenti.

Sono considerati sospetti i titoli 1:80; titoli superiori sono diagnosticamente significativi.

11. LIMITAZIONI DEL TEST

Il prozona è stato studiato con la sospensione di Brucella perché più soggetta a questo fenomeno. Non si sono evidenziati problemi con campioni ad alto titolo (1/640).

Poiché il fenomeno non può essere escluso in modo assoluto per campioni sospetti ripetere il test diluendo il campione almeno 1:4. Una reazione negativa con la sospensione di Brucella può verificarsi in presenza di

anticorpi incompleti presenti nelle infezioni croniche. La valutazione della presenza di anticorpi incompleti può essere effettuata aggiungendo alla miscela di reazione risultata negativa 10 µl di controllo positivo (REF 26007). Dopo nuova incubazione, l'assenza di agglutinazione indica la presenza di anticorpi incompleti nel siero testato.

Nel test in slide ed in automatico l'agglutinazione della sospensione con antigeni H può essere causata anche da anticorpi che reagiscono con il lipopolisaccaride. La migliore discriminazione si ottiene esaminando l'agglutinato fioccoso in provetta.

12. STUDI DI COMPARAZIONE – SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

Una sperimentazione su sieri umani ottenuti da laboratori ospedalieri, il cui titolo era considerato come riferimento, ha consentito la valutazione della sensibilità delle sospensioni S. typhi O, S. typhi H, S. paratyphi BO, S. paratyphi BH. La sospensione S. typhi antigene H su 30 positivi ha dimostrato una sensibilità del 96.8% mentre la sospensione S. typhi antigene O su 51 positivi aveva 2 falsi negativi ed una sensibilità del 96.2%.

La sospensione S. paratyphi B antigene H ed antigene O è stata testata rispettivamente con 12 e 24 campioni positivi. Si è ottenuta una sensibilità del 100% e del 91.7% rispettivamente.

Le sospensioni S. paratyphi A antigene O ed antigene H sono state analizzate in parallelo ad un prodotto in commercio. Si avevano 12 sieri positivi e 3 dubbi. Il reattivo Diesse aveva un falso negativo e quindi una sensibilità del 95.0% considerando i dubbi come positivi. Con lo stesso criterio si sono analizzati 45 campioni positivi per la brucellosi. Il reattivo Diesse ha dato 2 Falsi negativi e quindi una sensibilità del 95.7%.

Sono stati inoltre analizzati sieri umani trovati negativi ad un test in commercio. Si è ottenuto il seguente risultato:

Sospensione	N. campioni	Specificità %
S. typhi antigene O	93	97.4
S. typhi antigene H	58	95.1
S. paratyphi B antigene O	96	97.0
S. paratyphi B antigene H	93	95.9
S. paratyphi A antigene O	82	98.8
S. paratyphi A antigene H	80	97.6
Brucella	83	97.6

13. BIBLIOGRAFIA

1. P. Nicoletti in F. Pasquinelli: Diagnostica e Tecnica di Laboratorio Vol. 2 p. 319. Rosini ed. Firenze 1981.
2. Edwards P.R., Ewing W.H. Identification of Enterobacteriaceae 3rd ed. Burgess Publishing Co.
3. Cruickshank R. Medical Microbiology 11th Ed., p. 907 (1965).
4. Huddleson I.F. and Abell E. J. Inf. Dis. 42: 242 (1928).
5. Elżbieta Monika Galińska, Jerzy Zagórski Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2013, Vol 20, No 2, 233-238



INSTRUCTIONS FOR USE

W.W.-DAT

For the determination of anti-Salmonella and anti-Brucella specific agglutinating antibodies

For In vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

Method for the determination of specific agglutinating antibodies in human serum using colored Salmonella and Brucella suspensions.

2. INTRODUCTION

Serological studies of patients with persistent fever can be useful in detecting typhoid fever and brucellosis.

The test consists in the observation of a direct agglutination reaction between the bacterial suspension and the serum sample which is suspected of containing specific antibodies. The present method, known as the Widal-Wright reaction, allows a semiquantitative titration of the serum agglutinins.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The serum sample is mixed with a bacterial suspension at the optimal concentration for the semi-automated test on the AUTO-DAT instrument and/or in slide.

The titer is attributed with a software processing of the image of the agglutinate, which is obtained in microplate wells, and stored in the instrument.

The bacterial suspensions can also be used to perform the test in slide and / or tube.

4. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

All material of human origin must be handled as potentially infectious. This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth.
2. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay.
3. Wash hands thoroughly when finished.
4. Consult the relative Material Safety Data Sheet (available on request) for all the information on safety concerning the reagents contained in the kit.
5. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical Precautions

Bring the devices to room temperature (18-30°C) before use.

1. After use, return reagents to 2-8°C.
2. Do not use strongly hemolyzed, lipemic, icteric samples, serum not completely coagulated or samples presenting microbial contamination.
3. Do not use the reagents after expiry date.
4. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
5. Do not modify the Test Procedure.

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

Reagents are sufficient to perform 100 tests in automation with AUTO-DAT (700 tests).

Reagents are sufficient to analyze 60 samples in slide.

BACTERIAL SUSPENSION BACTERIAL SUSPENSION 1 x 2.5 mL

of the following suspensions:

- S. THYPHI O
- S. THYPHI H
- S. PARATHYPHI A O
- S. PARATHYPHI A H
- S. PARATHYPHI B O
- S. PARATHYPHI B H
- BRUCELLA

Contents: Suspension of stained, killed bacteria at an optimized concentration for slide test performance.

Contains sodium azide 0.09% as preservative.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 1 mL

Contents: Polyvalent positive control serum of animal origin, containing sodium azide 0.09% as preservative. Contains antibodies which agglutinate all the bacterial suspensions of the kit.

CONTROL - NEGATIVE CONTROL

1 x 1 mL

Contents: Negative control serum containing Proclin and Gentamicin as preservative.

BRING REAGENTS TO ROOM TEMPERATURE BEFORE USE**OTHER MATERIALS:**

- Slides (3)
- Mixing sticks (100)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- Pipettes with disposable needles
- Physiological saline
- 96-well microplates with flat bottom, Auto-DAT Microplate [REF] 26005
- Single use tubes for tube test.
- AUTO-DAT instrument ([REF] 26000)

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

The stability of the reagents does not change after opening the bottle, provided that the user is careful to keep the product safe from possible microbial contamination.

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

Fresh serum may be stored at 2/8°C for 7 days. For longer storage, freeze at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times.

Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Use immediately after thawing.

8. PROCEDURE

Bring the reagent to room temperature and mix the vial of bacterial suspension carefully but not vigorously.

INSTRUMENTAL APPLICATION WITH AUTO-DAT

Pipette 25 µL of sample and 25 µL of reagent into a microplate well ([REF] 26005). Insert the microplate into the instrument and press START. The instrument, at the end of the reaction (which lasts about 15 minutes) will print the result in titer.

SCREENING TEST

If the test on AUTO-DAT cannot be performed, reagents may be used for a screening test.

Distribute 20 µL of test serum into the slide circle. Add 40 µL of suspension and mix; rotate the slide and read after exactly one minute. Positive samples will give agglutination while negative samples will remain homogeneous.

TUBE TRITATION

Dilute the sample 1:20 with physiological saline (0.1 mL serum + 1.9 mL saline). Take 1 mL from the first tube and make serial dilutions with 1 mL of saline, as shown in the

scheme. Add 40 µL of suspension to each tube, mix and incubate overnight at 37°C (see the scheme shown below). The blank is performed by mixing the suspension with saline.

Tube	1	2	3	4	5	6	7
Saline Solution ml	1.9	1	1	1	1	1	1
Serum ml	0.1						
Mix and transfer ml	1	1	1	1	1	1	1
Dilution/ Titer	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280

9. TEST VALIDATION ON AUTO-DAT

Using 25 µL of **Positive Control** serum, perform the test on AUTO-DAT and compare the result with the titers reported on the certificate of analysis. +/- one titer dilution deviations are accepted.

If the result is different from the expected, contact the Scientific Support:

Tel: 0039 0577 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION OF THE TEST**Positive reaction**

Instrumental application with AUTO-DAT: the titer is printed.

Screening test: presence of agglutinate compared to negative control.

Tube titration: presence of granular (antigen O) or flocculant (antigen H) agglutinate with clear supernatant in comparison with the blank.

Negative reaction

Instrumental application with AUTO-DAT: the printing reports that the sample is negative.

Screening test: absence of agglutinate compared to negative control. Homogeneous suspension.

Tube titration: absence of agglutinate compared to negative control. Homogeneous suspension.

The titer is given by the highest dilution able to agglutinate the present bacteria.

Titers 1:80 are considered suspect; higher titers are diagnostically significant.

11. LIMITATIONS OF THE TEST

The prozone has been studied with the Brucella suspension which is more subject to this phenomenon. No problems have been found with high-titer samples (1/640).

Since the phenomenon cannot be absolutely excluded for suspected samples, repeat the test by diluting the sample at least 1:4. A negative reaction with the Brucella suspension can occur in presence of incomplete antibodies in chronic infections. The evaluation of the presence of incomplete antibodies can be performed adding 10 µl of positive control (REF 26007) to the reaction mix that resulted negative. After

new incubation, the absence of agglutination indicates the presence of incomplete antibodies in the tested serum.

In the slide and automated test, the agglutination of the H antigens suspension can also be caused by antibodies that react with the lipopolysaccharide. Differentiation is best obtained by examining the flaky agglutination in the tube.

12. METHOD COMPARISON – DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

An experimentation performed on human sera obtained from hospital laboratories, the titers of which were taken as reference, allowed the evaluation of the sensitivity of the suspensions *S. typhi* O, *S. typhi* H, *S. paratyphi* BO, *S. paratyphi* BH. When *S. typhi* antigen H was determined on 30 positive samples, a sensitivity of 96.8% was found, while the suspension *S. typhi* antigen O tested on 51 positive samples gave 2 false negative results and a sensitivity of 96.2%. The *S. paratyphi* B antigen H and antigen O suspensions were tested with 12 and 24 positive samples, respectively. A sensitivity of 100% and 91.7% were obtained respectively.

The suspensions *S. paratyphi* A antigen O and antigen H were tested in parallel with another commercial product. 12 positive and 3 doubtful results were found. The Diesse reagent gave 1 false negative and therefore the sensitivity was 95.0% considering the doubtful results as positive. With the same criteria, 45 positive samples for Brucellosis were tested. The Diesse reagent gave 2 false negative results and therefore the sensitivity was 95.7%.

Human sera found negative in another commercial test were also tested, with the following results:

Suspension	No. of samples	Specificity %
<i>S. typhi</i> antigene O	93	97.4
<i>S. typhi</i> antigene H	58	95.1
<i>S. paratyphi</i> B antigene O	96	97.0
<i>S. paratyphi</i> B antigene H	93	95.9
<i>S. paratyphi</i> A antigene O	82	98.8
<i>S. paratyphi</i> A antigene H	80	97.6
Brucella	83	97.6

13. REFERENCES

1. P. Nicoletti in F. Pasquinelli: Diagnostica e Tecnica di Laboratorio Vol. 2 p. 319. Rosini ed. Firenze 1981.
2. Edwards P.R., Ewing W.H. Identification of Enterobacteriaceae 3rd ed. Burgess Publishing Co.
3. Cruickshank R. Medical Microbiology 11th Ed., p. 907 (1965).
4. Huddleson I.F. and Abell E. J. Inf. Dis. 42: 242 (1928).
5. Elżbieta Monika Galińska, Jerzy Zagórski Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2013, Vol 20, No 2, 233-238



INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION

W.W.-DAT

Pour la détermination des anticorps anti-Salmonelles spécifiques agglutinantes et anti-Brucella

Pour Diagnostic in vitro seulement

1. UTILISATION

Méthode qu'il utilise suspensions colorées de Salmonelle et Brucella pour la détermination des anticorps agglutinants spécifiques dans le sérum humain.

2. INTRODUCTION

L'enquête sérologique des patientes qui présente fièvre persistante peut aider dans le diagnostic de la fièvre typhoïdique et de la brucellose. Techniquement le test est effectué en observant l'agglutination directe des suspensions bactériennes causée par des anticorps spécifiques éventuellement présentes dans le sérum du patient. La méthode est connue comme réaction de Widal-Wright et elle permet, en testant les dilutions dégressives du serum, d'effectuer un titrage semi-quantitatif des anticorps présents.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le sérum à tester est mis à réagir avec la suspension bactérienne à la concentration optimisée pour effectuer le test en technique semi-automatique sur l'instrument AUTO-DAT et/ou en slide.

Le titre est attribué avec une élaboration logiciel de l'image de l'agglutiné, obtenu en puits de microplaque, et mémorisé à l'intérieur de l'instrument.

Les suspensions bactériennes peuvent être utilisées pour effectuer le test en slide et/ou en éprouvette aussi.

4. PRÉCAUTIONS

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO SEULEMENT.

Tout matériel d'origine biologique doit être considéré comme potentiellement infecté. Ce kit contient des matériaux d'origine humaine qui ont été testés et qui se sont révélés négatifs pour les anticorps HBsAg et anti-VIH-1, anti-VIH-2 et anti-VHC. Etant donné qu'aucun test de diagnostic ne peut offrir une garantie complète sur l'absence d'agents infectieux, tout matériel d'origine humaine doit être considéré comme potentiellement infecté.

Tous les réactifs et les échantillons doivent être manipulés conformément aux normes de sécurité normalement adoptées par le laboratoire.

Élimination des déchets: les échantillons de sérum et les réactifs utilisés doivent être traités comme des résidus infectés, puis éliminés conformément à la législation en vigueur.

Avertissements pour la sécurité personnelle

1. Ne pas pipeter avec la bouche.
2. Utiliser des gants jetables et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et pendant le test.
3. Laver soigneusement les mains une fois le test est terminé.
4. À propos des caractéristiques de sécurité des réactifs contenus dans le kit, reporter à la fiche des données de sécurité (disponible sur demande).
5. Déversements éventuels de matériel potentiellement infecté doit être immédiatement éliminé avec du papier absorbant et la zone polluée doit être décontaminée, par exemple avec de l'hypochlorite de sodium à 1%, avant de poursuivre le travail. Si un acide est présent, l'hypochlorite de sodium ne doit pas être utilisé avant que la zone ne sèche.
Tous les matériaux utilisés pour décontaminer tout déversement accidentel, y compris les gants, doivent être jetés comme déchets potentiellement infectieux.
Ne pas autoclaver les matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.

Informations analytiques

Avant de l'usage, amener les appareils à utiliser à température ambiante. (18-30°C).

1. Après l'usage amener les réactifs à 2-8°C.
2. Ne pas utiliser les échantillons fortement hémolysés, lipémiques, ictériques, de sérum non complètement coagulé ou les échantillons présentant une contamination microbienne.
3. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
4. Éviter la contamination microbienne des réactifs car cela réduirait la validité du produit et pourrait donner des résultats incorrects.
5. Ne pas modifier la Procédure.

5. COMPOSITION DU KIT ET PREPARATION DES RÉACTIFS

Les réactifs sont suffisants pour effectuer 100 tests en automatisation avec AUTO-DAT (700 tests).

Les réactifs sont suffisants pour analyser 60 échantillons en slide.

BACTERIAL SUSPENSION SUSPENSION BACTÉRIENNE

1 x 2.5 mL

des suspensions suivantes:

- S. THYPHI O
- S. THYPHI H
- S. PARATHYPHI A O
- S. PARATHYPHI A H
- S. PARATHYPHI B O
- S. PARATHYPHI B H
- BRUCELLA

Contenu:

Suspension de bactéries tuées et colorées à une concentration optimisée pour effectuer le test en slide. Contient 0.09% d'azoture de sodium comme conservateur.

CONTRÔLE + CONTRÔLE POSITIF

1 x 1 mL

Contenu: Sérum de contrôle positif polyvalent d'origine animale contenant 0.09% d'azoture de sodium comme conservateur. Contient des anticorps qui agglutinent toutes les suspensions bactériennes dans le kit.

CONTRÔLE - CONTRÔLE NÉGATIF**1 x 1 mL**

Contenu: Sérum de contrôle négatif contenant du Proclin et de la Gentamicina comme agent de conservation.

AMENER LES RÉACTIFS À LA TEMPÉRATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION**AUTRE MATERIEL:**

- Slides (3)
- bâtons de mélange (100)

AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI:

- Pipettes à embouts jetables
- Solution physiologique
- Microplaques de 96 puits à fond plat, microplaque Auto-DAT (REF 26005)
- Éprouvettes jetables pour le test en éprouvette
- Dispositif AUTO-DAT (REF 26000)

6. MODALITÉ DE CONSERVATION ET STABILITÉ DES RÉACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à 2/8°C.

La date d'expiration est imprimée sur chaque composant et sur l'étiquette extérieure de l'emballage.

La stabilité des réactifs ne change pas après l'ouverture du flacon, à condition que l'utilisateur fasse attention à maintenir le produit à l'abri d'une éventuelle contamination microbienne.

7. TYPE D'ÉCHANTILLON ET CONSERVATION

Lactosérum frais stocké à 2/8°C pendant 7 jours maximum. Pour des périodes de stockage prolongées, congeler à -20°C, il peut subir jusqu'à 3 décongelations.

Évitez d'utiliser des congélateurs automatiques à dégivrage pour le stockage des échantillons. Utilisez immédiatement après la décongelation.

8. PROCÉDURE

Amener le réactif à température ambiante et agiter le flacon de suspension bactérienne avec précaution, mais sans vigueur.

APPLICATION INSTRUMENTAL AVEC AUTO-DAT

Pipeter 25 µL d'échantillon et 25 µL de réactif dans un puit de microplaque (REF 26005). Insérez la microplaque dans l'instrument et appuyez sur START. L'instrument, à la fin de la réaction (qui dure environ 15 minutes), affichera le résultat dans le titre.

TEST DE DÉPISTAGE

Si le test AUTO-DAT ne peut pas être effectué, les réactifs peuvent être utilisés pour un test de dépistage.

Distribuer 20 µL de sérum à tester dans le cercle de la slide.

Ajouter 40 µL de suspension et mélanger; tournez la slide et regardez après une minute exacte.

L'agglutination se produira dans les échantillons positifs tandis qu'avec les négatifs la suspension restera homogène.

TITRAGE DANS ÉPROUVETTE

Diluer l'échantillon à 1:20 avec une solution physiologique (0.1 mL de

sérum + 1.9 mL de solution physiologique). Prendre 1 mL du premier tube et faire des dilutions en série avec 1 mL de solution saline, comme indiqué dans le schéma. Ajouter 40 µL de suspension dans chaque tube, agiter et incubé à 37°C pendant une nuit (voir le diagramme ci-dessous).

Le test à blanc est réalisé en mélangeant la suspension avec du physiologique.

Éprouvette	1	2	3	4	5	6	7
Sol. Phys. mL.	1.9	1	1	1	1	1	1
Sérum ml	0.1						
Mélanger et transférer ml	1	1	1	1	1	1	1
Dilution/ Titre	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280

9. VALIDATION DU TEST SUR AUTO-DAT

En utilisant 25 µL de sérum de contrôle positif, effectuer le test AUTO-DAT et comparer le résultat avec les titres figurant dans le certificat d'analyse. Les +/- écarts d'une dilution de stock sont acceptés.

Si le résultat est différent de celui attendu, contactez le Support Scientifique:

Tel: 0039 0577 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRÉTATION DU TEST**Réaction positive**

Application instrumentale avec AUTO-DAT: le titre est imprimé.

Test de dépistage: présence d'un agglutinat par rapport au contrôle négatif.

Titration dans éprouvette: présence d'un agglutinat d'aspect granulaire (antigène O) ou floculé (antigène H) de surnageant clair vis-à-vis du blanc.

Réaction négative

Application instrumentale avec AUTO-DAT: il est imprimé que l'échantillon est négatif.

Test de dépistage: absence d'agglutinat par rapport au contrôle négatif. Suspension homogène.

Titration dans éprouvette: absence d'agglutinat par rapport au contrôle négatif. Suspension homogène.

Le titre est donné par la plus haute dilution capable d'agglutiner les bactéries présentes.

Les titres 1:80 sont considérés comme suspects; des titres plus élevés sont utiles pour le diagnostic.

11. LIMITES DU TEST

La prozone a été étudiée avec la suspension de Brucella car plus sujette à ce phénomène. Les échantillons à titre élevé (1/640) ne présentaient aucun problème.

Puisque le phénomène ne peut pas être absolument exclu pour les échantillons suspects, répéter le test en diluant l'échantillon au moins à 1:4. Une réaction négative avec la suspension de Brucella peut survenir en présence d'anticorps incomplets présents dans les infections chroniques. L'évaluation de la présence d'anticorps incomplets peut se faire par l'ajout de 10 µL de contrôle positif au mélange réactif obtenu négatif (REF 26007). Après une nouvelle

incubation, l'absence d'agglutination indique la présence d'anticorps incomplets dans le sérum testé.

Dans le test en slide et automatiquement, l'agglutination de la suspension avec les antigènes H peut également être provoquée par des anticorps qui réagissent avec le lipopolysaccharide. La meilleure discrimination est obtenue en examinant l'agglutinat floclé dans éprouvette.

12. ÉTUDES DE COMPARARISON – SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE

Une expérimentation sur des sérums humains provenant de laboratoires hospitaliers, dont le titre a été considéré comme une référence, a permis d'évaluer la sensibilité des suspensions S. typhi O, S. typhi H, S. paratyphi BO, S. paratyphi BH. L'antigène H de S. typhi en suspension sur 30 positifs a montré une sensibilité de 96.8% alors que l'antigène en suspension de S. typhi O sur 51 positif avait 2 faux négatifs et une sensibilité de 96.2%.

Les suspensions d'antigènes H et O de S. paratyphi B ont été testées avec respectivement 12 et 24 échantillons positifs. Une sensibilité de 100% et 91,7% a été atteinte respectivement.

Les suspensions de S. paratyphi A antigène O et antigène H ont été analysées en parallèle avec un produit commercialisé. Il y avait 12 sérums positifs et 3 doutes. La Diesse réactive avait un faux négatif et donc une sensibilité de 95.0% en considérant les doutes comme positifs. Avec le même critère, 45 échantillons positifs pour la brucellose ont été analysés. Le réactif de Diesse a donné 2 faux négatifs et donc une sensibilité de 95.7%.

Les sérums humains trouvés négatifs pour un test commercial ont également été analysés. Le résultat suivant a été obtenu:

Suspension	N. échantillons	Spécificité%
S. typhi antigene O	93	97.4
S. typhi antigene H	58	95.1
S. paratyphi B antigene O	96	97.0
S. paratyphi B antigene H	93	95.9
S. paratyphi A antigene O	82	98.8
S. paratyphi A antigene H	80	97.6
Brucella	83	97.6

13. BIBLIOGRAPHIE

- P. Nicoletti in F. Pasquinelli: Diagnostica e Tecnica di Laboratorio Vol. 2 p. 319. Rosini ed. Firenze 1981.
- Edwards P.R., Ewing W.H. Identification of Enterobacteriaceae 3rd ed. Burgess Publishing Co.
- Cruickshank R. Medical Microbiology 11th Ed., p. 907 (1965).
- Huddleson I.F. and Abell E. J. Inf. Dis. 42: 242 (1928).
- Elżbieta Monika Galińska, Jerzy Zagórski Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2013, Vol 20, No 2, 233-238

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbicante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote
	EN ES IT	CE marking of conformity Marcado CE de conformidad Marcatura CE di conformità	FR GR PT	Marquage de conformité CE Σημανση συμμορφωσης CE Marcação CE de conformidade