



DIESSE Diagnostica Senese SpA

Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI

Tel. ++39/0577/ 587111 - Fax ++39/0577/318690

ISTRUZIONI PER L'USO**WW MICRO 6****REF** 21150**(Italiano)****1. UTILIZZAZIONE**

SOSPENSIONI BATTERICHE COLORATE DI SALMONELLA E BRUCELLA PER LA DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA NEL SIERO DI ANTICORPI AGGLUTINANTI SPECIFICI. IL TEST VIENE EFFETTUATO IN MICROPIASTRA.

2. INTRODUZIONE

L'indagine sierologica su pazienti che presentano febbre persistente può aiutare nella diagnosi della febbre tifoidea e della brucellosi (1,2). 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

Una sospensione di batteri uccisi e colorati viene incubata con diluizioni scalari del siero in esame in pozzetti ad U di una piastra. Alla fine del test (incubazione di una notte) si osserverà se siamo in presenza di reazione negativa (bottone di batteri sedimentati) o positiva (cellule batteriche agglutinate).

4. COMPOSIZIONE DEL KIT

- Il kit contiene reagenti sufficienti per 600 tests.
- Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

BACTERIAL SUSPENSION SOSPENSIONE BATTERICA 1 flacone x 5 mL di ciascuna delle seguenti sospensioni batteriche:

- Brucella
- S. typhi antigene O (gruppo D)
- S. typhi antigene H
- S. paratyphi B antigene O
- S. paratyphi B antigene H
- S. paratyphi A totale

Contenuto: Sospensione di batteri uccisi e colorati a concentrazione ottimizzata per effettuare il test su micropiastra. Contiene sodio azide 0,09% come conservante.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 2 mL

Contenuto: Siero di controllo polivalente di origine animale contenente e sodio azide 0,09% come conservante. Pronto all'uso.

ALTRI MATERIALI FORNITI

- 6 piastre da 96 pozzetti ad U.

ALTRI MATERIALI OCCORRENTI MA NON FORNITI

- Pipette con puntali disposable.
- Soluzione fisiologica.

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

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

I reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE
SOSPENSIONE BATTERICA
CONTROLLO POSITIVO

CONDIZIONI
2 mesi a 2/8°C
2 mesi

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

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

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I reagenti contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.
3. Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
4. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, 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 pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. **Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C).** Dopo l'uso, svuotare il contagocce e riporre i reagenti a 2/8°C.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Siero fresco conservato a 2/8°C per un massimo di 7 gg. 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.

Diluire 10 µL del siero in esame con 90 µL di soluzione fisiologica nel primo pozzetto dello strip. Distribuire 50 µL di fisiologica negli altri pozzetti e diluire per raddoppio 50 µL della soluzione del primo pozzetto portandola nel secondo. Proseguire fino all'ultimo pozzetto scartando gli ultimi 50 µL (vedi Schema). Aggiungere a ciascun pozzetto 1 goccia (50 µL) di sospensione batterica agitata accuratamente, ma non vigorosamente. Mescolare ed incubare a 37°C per almeno 18 ore, coprendo accuratamente e meglio ancora, inserendo in una camera umida per evitare evaporazione. Alla fine del test lasciare le piastre in riposo per almeno un'ora su un piano sicuramente privo di vibrazioni per migliorare la lettura.

50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
90 µl fisiol. + 10µl siero	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl Cont.Pos.	50µl fisiol.
50µl sospen- sione											
Titolo 1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	C.P.	NEG.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Si utilizza il siero di controllo positivo utilizzando 1 goccia (50 µL) da far reagire in un pozzetto con 1 goccia (50 µL) di sospensione batterica.

Dopo l'incubazione si deve avere reazione positiva. Per il controllo della reazione negativa si sostituisce il campione con 50 µL di fisiologica e si procede come sopra. Si deve produrre un bottone non agglutinato ben visibile.

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST - VALORI NORMALI

Reazione positiva: I batteri agglutinati si distribuiscono sul fondo del pozzetto a formare un tappeto omogeneo. Utilizzando la sospensione "H" la formazione di un piccolo bottone circondato da un tappeto di batteri agglutinati è da considerarsi come reazione positiva.

Reazione negativa: I batteri si raccolgono sul fondo del pozzetto formando un bottone intensamente colorato.

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

11. LIMITAZIONI DEL TEST

Nelle agglutinzioni in pozzetto si ha cross-reazione fra anticorpi anti O e sospensione H per cui si ha generalmente sovrastima del titolo H.

12. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' 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 96.7% mentre la sospensione S. typhi antigene O su 51 positivi aveva 1 falso negativo ed una sensibilità del 98.1%.

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 96.0% 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 non aveva falsi negativi e quindi una sensibilità del 100%. 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:

<u>Sospensione</u>	<u>N. campioni</u>	<u>Specificità %</u>
S. typhi antigene O	76	96.2
S. typhi antigene H	58	95.1
S. paratphi B antigene O	96	98.0
S. paratyphi B antigene H	93	95.9
S. paratyphi A Total	82	98.8
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.



DIESSE Diagnostica Senese SpA

Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI

Tel. ++39/0577/ 587111 - Fax ++39/0577/318690

INSTRUCTIONS FOR USE**WW MICRO 6****REF** 21150**(English)****1. INTENDED USE**

STAINED BACTERIAL SUSPENSIONS OF SALMONELLA AND BRUCELLA FOR THE SEMIQUANTITATIVE DETERMINATION OF SPECIFIC AGGLUTINATING ANTIBODIES. THE TEST IS PERFORMED ON A MICRPLATE.

2. INTRODUCTION

Serological studies of patients with persistent fever can be useful in detecting typhoid fever and brucellosis (1,2).

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 test involves mixing a suspension of inactivated coloured bacteria with two fold serial dilutions of test serum in U bottom wells. After incubation overnight, a positive serum determines the agglutination of bacteria. If the bacterial cells settle in compact buttons, the result of the test is negative.

4. KIT COMPOSITION

- The reagents are sufficient for 600 tests.
- Bring the reagents to room temperature before use.

BACTERIAL SUSPENSION BACTERIAL SUSPENSION 1 vial x 5 mL of each of the following bacterial suspensions:

- Brucella
- S. typhi antigene O (group D)
- S. typhi antigene H
- S. paratyphi B antigen O
- S. paratyphi B antigen H
- S. paratyphi A total

Contents: Suspension of stained, killed bacteria at an optimized concentration for performance of the microplate test. Contains sodium azide 0,09% as preservative.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 2 mL

Contents: Polyvalent control serum of animal origin, containing sodium azide 0,09% as preservative. Ready for use.

OTHER MATERIALS SUPPLIED

- 6 96-well U-bottom microtiter plates

OTHER MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Pipettes with disposable needles.
- Physiological saline.

5. 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.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
BACTERIAL SUSPENSION	2 months
POSITIVE CONTROL	2 months

6. PRECAUTIONS**FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.**

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. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The reagents contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.
3. If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
4. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% 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

1. **Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use.** After use, empty the dropper and return reagents to the recommended storage temperature (2-8°C).
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure.

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.

Mix 10 µL of test serum with 90 µL of saline in the first well of a strip. Distribute 50 µL of saline in the other wells and make serial two-fold dilutions along the row discarding the last 50 µL. Add 1 drop (50 µL) of carefully mixed homogeneous bacterial suspension to each well (see table). Mix and incubate at 37°C for at least 18 hours, covering carefully and, if possible, placing in a humid chamber to avoid evaporation. Avoid any kind of vibration. At the end of the incubation period, leave the plate to settle for at least one hour, to improve the reading.

50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl 50 µl



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
90 µl fisiol. + 10µl siero	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl fisiol	50µl Cont.Pos.	50µl fisiol.
50µl sospensione											
Titolo 1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	C.P.	NEG.

9. TEST VALIDATION

Carry out the test using 1 drop (50 µL) of positive control in a well with 1 drop of bacterial suspension. After incubation a positive reaction should be given. To control the negative reaction use 1 drop (50 µL) of saline instead of the sample. A non-agglutinated button must be clearly visible.

10. INTERPRETATION OF THE TEST – NORMAL VALUESPositive reaction

The agglutinated bacteria cover the bottom of the well in a homogeneous layer. When using the “H” suspension, small buttons surrounded by a layer of agglutinated bacteria has to be considered as a positive reaction.

Negative reaction

The bacteria settle in a compact brightly coloured button.

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

11. TEST LIMITATIONS

In the microplate agglutination test there may be a cross-reactoin between O and H suspensions, and there is therefore generally an overestimation of the H titer.

12. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

An experimentation performed on human sera obtained from hospital laboratories, the titers of which were taken as reference, allowed an evaluation of the sensitivity of the following 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 96.7% was found, while the suspension S. typhi antigen O tested on 51 positive sera gave 1 false negative and a sensitivity of 98.1%.

S. paratyphi B antigen H and antigen O were tested with respectively 12 and 24 positive samples. Sensitivity was 100% and 96.0% respectively.

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 Dienes reagent gave no false negative reactions and the sensitivity was therefore 100%. Using the same criteria, 45 positive samples for Brucellosis were tested. Dienes gave 2 false negative results and the sensitivity was therefore 95.7%. Human sera found negative in another commercial test were also studied. The following results were obtained:

<u>Suspension</u>	<u>No. of samples</u>	<u>Specificity %</u>
S. typhi antigen O	76	96.2
S. typhi antigen H	58	95.1
S. paratyphi B anrtigen O	96	98.0
S. paratyphi B antigen H	93	95.9
S. paratyphi A Total	82	98.8
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.

	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 jusqu'e 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



Diesse Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) – Italy
Tel. 0577-587111