

fr HYDATIDOSE FUMOUCZ®



SÉRODIAGNOSTIC DE L'HYDATIDOSE PAR HÉMAGGLUTINATION INDIRECTE

BUT DU TEST :

HYDATIDOSE FUMOUCZ® permet la détermination quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Echinococcus granulosus* par hémagglutination indirecte.

PRINCIPE :
HYDATIDOSE FUMOUCZ® est basé sur le principe de l'hémagglutination indirecte. Les hématies sensibilisées sont constituées d'hématies de mouton recouvertes par un antigène *Echinococcus granulosus*. La présence d'anticorps sériques anti-*Echinococcus granulosus* entraîne une agglutination des hématies sensibilisées qui se traduit par un voile rouge / marron tapissant la cupule. En l'absence d'anticorps spécifiques, ces hématies sédimentent au fond de la cupule sous la forme d'un anneau. Les hématies non sensibilisées assurent la spécificité de la réaction et permettent d'éliminer les interférences dues aux agglutinines naturelles anti-mouton (hétéroanticorps de Forssman, anticorps de la mononucléose infectieuse...). La réaction s'effectue en microplaque à fond en U. La manipulation est simple et rapide. Les résultats sont obtenus en 2 heures.

COMPOSITION DU COFFRET :

- R1** : 1 flacon de 2,2 mL d'hématies sensibilisées
- BUF** : 1 flacon de 55 mL de tampon phosphate pH 7,2
- CONTROL +** : 1 flacon de 0,2 mL de contrôle positif titré
- MICROPLATE** : 2 microplaques à fond en U
- R2** : 1 flacon de 1 mL d'hématies non sensibilisées
- R3** : 1 flacon de 2 mL d'adsorbant
- CONTROL -** : 1 flacon de 0,2 mL de contrôle négatif
- DROPPER** : 2 compte-gouttes spéciaux

Remarques : - Utiliser exclusivement les compte-gouttes fournis dans le coffret.
- Ne pas inter-changer les compte-gouttes entre les réactifs **R1** et **R2**.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI :

- Microporteur multicanaux distribuant 50 µL
- Micropipette distribuant 50 µL, micropipette 100-1000 µL
- Conteneur pour déchets contaminés
- Tubes à hémolyse
- Centrifugeuse

STOCKAGE DES RÉACTIFS :

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Ils doivent être stockés à +2°... +8°C, jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. Ne pas congeler.

RECUEIL / PRÉPARATION / CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS :

Utiliser du sérum fraîchement prélevé. Les échantillons sériques peuvent être conservés 72 heures à +2°... +8°C. Si le test n'est pas effectué dans les 72 heures qui suivent le prélèvement, ils doivent être congelés à -20°C. Il est recommandé de préparer des aliquots pour éviter les congélations et décongélations successives. Ne pas décomplémenter le sérum. Ne pas utiliser de sérum hémolysé, trouble ou contaminé.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION :

- Pour diagnostic in vitro et pour usage professionnel uniquement. Les tests sont à usage unique.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.
- Respecter les instructions de la notice d'utilisation. Éviter tout contact de réactif avec la peau, les yeux et les muqueuses. Ne pas ingérer.
- Laisser les réactifs et les échantillons revenir à température ambiante avant d'effectuer le test.
- Agiter soigneusement les suspensions d'hématies avant utilisation.
- Lors de la distribution des réactifs **R1** et **R2**, veiller à ce que le compte-gouttes soit parfaitement vertical. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les gouttes, afin que les volumes délivrés soient constants.
- En cas de versement accidentel de réactif, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de versement de sérum, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.
- Les sérums, les réactifs ainsi que le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés dans un conteneur pour déchets contaminés, selon les recommandations et la réglementation en vigueur.
- Les réactifs **CONTROL** contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1%). L'azide de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des canalisations pour former des composés explosifs. Il est donc recommandé de ne pas jeter les réactifs dans un évier sans rincer abondamment.
- Tous les réactifs, sauf le réactif **BUF**, contiennent du matériel d'origine animale. Par conséquent, ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec précaution.

MODES OPÉRATOIRES :

Laisser les réactifs et les sérums à analyser revenir à température ambiante avant utilisation.

- Préparation d'une dilution mère du sérum à analyser (1/40)**
Distribuer dans un tube à hémolyse et mélanger : 50 µL de sérum à analyser et 1,95 mL de réactif **BUF**.
- Réalisation du test sur microplaque**
 - A l'aide d'une micropipette multicanaux, distribuer 50 µL de réactif **BUF** dans 8 cupules de la microplaque.
 - Distribuer 50 µL de la dilution mère du sérum dans la 1^{re} cupule. Mélanger avec le réactif **BUF** et reporter à l'aide d'une micropipette, 50 µL de la 1^{re} cupule dans la 2^{me}, de la 2^{me} dans la 3^{me}, et ainsi de suite jusqu'à la 6^{me} cupule, en rejetant 50 µL de la 6^{me} cupule. On obtient les dilutions suivantes :

N° cupule (voir annexe)	Cupule I	Cupule II	Cupule III	Cupule IV	Cupule V	Cupule VI
Dilution	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560

- Distribuer 50 µL de la dilution mère du sérum dans la 7^{me} cupule. Mélanger avec le réactif **BUF** et rejeter 50 µL. Cette dilution (1/80) constitue le témoin sérum, dont le rôle est de détecter les agglutinines naturelles anti-mouton que peuvent contenir certains sérums.
 - Agiter soigneusement les réactifs **R1** et **R2**.
 - Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans les 6 premières cupules.
 - Déposer 1 goutte de réactif **R2** dans la 7^{me} cupule (témoin sérum - cupule VII - voir annexe).
 - Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans la 8^{me} cupule (témoin réactif - cupule VIII - voir annexe) dont le rôle est de contrôler la validité du réactif **BUF** et du réactif **R1**.
- Remarque : Ne réaliser qu'un seul témoin réactif par série de tests.
- Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules manuellement, par tapotements latéraux sur les côtés de la microplaque, posée à plat, ou à l'aide d'un agitateur vibreur pour plaques à microtitration. Ne pas utiliser d'agitateur orbital. Laisser ensuite la plaque immobile, à l'abri de toute vibration.
 - Lire la réaction 2 heures plus tard.

ADSORPTION DES AGGLUTININES NATURELLES ANTI-MOUTON EN CAS D'AGGLUTINATION DU TÉMOIN SÉRUM :

- Distribuer dans un tube et mélanger : 0,1 mL de sérum et 0,3 mL de réactif **R3**.
- Laisser incuber 60 min à température ambiante.
- Centrifuger à 800 g pendant 15 min.
- Recueillir le surnageant ; le sérum est alors dilué au 1/4.
- Diluer le surnageant au 1/10 dans du réactif **BUF** pour obtenir une dilution mère (1/40) adsorbée.
- Prendre le protocole de "Réalisation du test sur microplaque" en remplaçant la dilution mère par la dilution mère adsorbée.

CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE :

- Chaque coffret **HYDATIDOSE FUMOUCZ®** contient un **CONTROL +** de titre connu et un **CONTROL -**. Ils sont prêts à l'emploi et doivent être traités comme les sérums à analyser. Ils permettent de valider le test. Le titre du **CONTROL +** doit être égal au titre annoncé sur l'étiquette du flacon à ± une dilution. Le **CONTROL -** doit présenter une absence d'hémagglutination. Si tel n'est pas le cas, le test n'est pas valide.
- Le témoin sérum doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, il est nécessaire de renouveler le test après avoir éliminé les agglutinines naturelles anti-mouton du sérum par adsorption.
- Le témoin réactif doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, le réactif **HYDATIDOSE FUMOUCZ®** n'est pas utilisable.

LECTURE DES RESULTATS :

ABSENCE D'HÉMAGGLUTINATION Présence d'un anneau plus ou moins large au fond de la cupule.	RÉACTION NÉGATIVE
PRÉSENCE D'HÉMAGGLUTINATION Présence d'un voile rouge / marron tapissant la cupule ; parfois, présence d'un fin liseré périphérique.	RÉACTION POSITIVE

Une image réactionnelle d'hémagglutination, obtenue avec un sérum positif au 1/1280, est représentée en annexe.

Le titre est donné par la première dilution présentant un anneau large et périphérique.

- Remarques :
- En cas de réaction positive dans les 6 premières cupules, poursuivre les dilutions pour rechercher le titre d'hémagglutination limite.
 - Certains sérums, dont la concentration en anticorps est très élevée, peuvent donner lieu à un phénomène de zone (avec rétraction du voile) dans les premières dilutions, qui disparaît dans les dilutions suivantes.
 - La qualité des réactifs permet d'exécuter la réaction le soir et d'effectuer la lecture le lendemain matin, à condition que la microplaque ne subisse aucun déplacement et soit à l'abri des vibrations.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

TITRE < 1/160	Réaction non significative Absence probable d'hydatidose. Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoelectrophorèse.
TITRE = 1/160	Réaction douteuse Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoelectrophorèse.
TITRE ≥ 1/320	Réaction significative en faveur d'une hydatidose évolutive.

PERFORMANCES :

Le développement de l'hydatidose est souvent lent et peu symptomatique, le diagnostic sérologique présente donc un grand intérêt. Le réactif **HYDATIDOSE FUMOUCZ®** est constitué d'hématies sensibilisées par un antigène *Echinococcus granulosus*. Il assure sensibilité et spécificité à la réaction. Une étude portant sur 221 sérums humains a démontré une sensibilité de 93,0 % (quelle que soit la localisation des kystes) et une spécificité de 94,9 %. Les comparaisons avec l'IFI et le test ELISA ont montré une remarquable complémentarité de ces différentes réactions (2). Dans tous les cas, il est nécessaire d'intégrer l'ensemble des données cliniques, épidémiologiques et biologiques avant d'établir le diagnostic final.

en ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ®



INTENDED USE: SERODIAGNOSIS OF ECHINOCOCCOSIS BY INDIRECT HAEMAGGLUTINATION

ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ® is an indirect haemagglutination test for the quantitative detection of anti-*Echinococcus granulosus* antibodies in serum samples.

PRINCIPE :
ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ® principle is based on indirect haemagglutination. Sensitized red blood cells are composed of sheep red blood cells coated with an *Echinococcus granulosus* antigen. Serum antibodies against *Echinococcus granulosus* are revealed by an agglutination of the sensitized red blood cells: a reddish-brown film can be observed in the well. In the absence of specific antibodies, these red blood cells deposit, forming a ring in well bottom. The unsensitized red blood cells ensure the reaction specificity and allow the elimination of interferences due to natural anti-sheep agglutinins (Forssman heteroantibodies, infectious mononucleosis antibodies...). The reaction is performed in U-microplate. The test procedure is easy and rapid. The results are obtained in 2 hours.

KIT CONTENT:

- R1**: 1 vial of 2.2 mL of sensitized red blood cells
- BUF**: 1 vial of 55 mL of phosphate buffer pH 7.2
- CONTROL +**: 1 vial of 0.2 mL of titrated positive control
- MICROPLATE**: 2 microplates with a U-bottom
- R2**: 1 vial of 1 mL of non-sensitized red blood cells
- R3**: 1 vial of 2 mL of adsorbent
- CONTROL -**: 1 vial of 0.2 mL of negative control
- DROPPER**: 2 special droppers

Notes : - Use exclusively the droppers provided in the kit.
- Do not interchange droppers between **R1** and **R2** reagents.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- Multi-channel micropipette delivering 50 µL
- Micropipette delivering 50 µL, micropipette 100-1000 µL
- Container for contaminated wastes
- Haemolysis tubes
- Centrifuge

STORAGE CONDITIONS:

Reagents are ready-to-use. Store at +2°...+8°C, until the expiry date indicated on the box. Do not freeze.

SAMPLES COLLECTION / HANDLING / STORAGE:

Use fresh withdrawn serum. The serum samples should be stored at +2°...+8°C for a period of 72 hours. If the sera are not tested within 72 hours after their collection, they must be stored (-20°C). It is recommended to prepare aliquots to avoid repeated freezings and defrostings. Do not perform a heat pre-treatment of serum. Do not use haemolysed, turbid or contaminated serum.

WARNINGS AND PRECAUTIONS:

- For in vitro diagnostic use and only for professional use. Tests are for single use only.
- Reagents and controls from different lots must not be interchanged.
- Follow the instructions for use. Avoid contact of reagent with skin, eyes and mucous membranes. Do not ingest.
- Allow the reagents and samples to return to room temperature prior to testing.
- Carefully shake the red blood cells suspensions before use.
- When delivering **R1** and **R2** reagents, make sure that the dropper needle is perfectly vertical. Check the absence of air bubbles in the drops to ensure constant delivery volumes.
- In case of accidental spill of reagents, clean the surface with absorbent paper and water. In case of spill of serum, clean the surface with absorbent paper and bleach.
- The samples, reagents as well as the contaminated materials and products must be eliminated in a container for contaminated wastes, according to the prevailing recommendations and regulations.
- Controls contain < 0.1 % sodium azide which may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Azide built-up can be avoided by flushing with large volumes of water following the disposal reagents.
- All reagents, except **BUF** reagent, contain material of animal origin. As a consequence, they have to be handled with care as hazardous components.

TEST PROCEDURES:

Before use, allow reagents and samples to return to room temperature.

- Preparation of 1:40 stock dilution of test serum**
Deliver in a haemolysis tube and mix: 50 µL of test serum and 1.95 mL of **BUF** reagent.
 - Test execution on microplate**
 - By means of a multi-channel micropipette, deliver 50 µL of **BUF** reagent in 8 wells of the microplate.
 - Add 50 µL of serum stock dilution in the 1st well. Mix with **BUF** reagent and transfer by means of a micropipette 50 µL from the 1st well into the 2nd well, from the 2nd into the 3rd, and so on until the 6th well. Discard 50 µL from the 6th well. The following dilutions are obtained:
- | Well number (see annex) | Well I | Well II | Well III | Well IV | Well V | Well VI |
|-------------------------|--------|---------|----------|---------|--------|---------|
| Dilution | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 |
- Add 50 µL of serum stock dilution into the 7th well. Mix with **BUF** reagent and discard 50 µL. This 1:80 dilution constitutes the serum control. It serves for the detection of natural anti-sheep agglutinins, which may occur in certain sera.
 - Carefully shake **R1** and **R2** reagents.
 - Distribute 1 drop of **R1** reagent in the first 6 wells.
 - Distribute 1 drop of **R2** reagent in the 7th well (serum control - well VII - see annex).
 - Distribute 1 drop of **R1** reagent in the 8th well (reagent control - well VIII - see annex). Its role is to control the validity of **BUF** reagent and **R1** reagent.
- Note : Set up only one reagent control per assays series.
- Very carefully homogenize wells content manually, by lateral thrumming on the edges of the microplate, placed flatwise or with a vibrator-shaker for microtitration plates. Do not use orbital shaker. Then allow the plate to remain motionless, protected from vibrations.
 - Read the reaction 2 hours later.

ADSORPTION OF NATURAL ANTI-SHEEP AGGLUTININS IN CASE OF AGGLUTINATION OF SERUM CONTROL:

- Deter in a tube and mix: 0.1 mL of serum and 0.3 mL of **R3** reagent .
- Incubate for 60 min at room temperature.
- Centrifuge at 800 g for 15 min.
- Collect the supernatant fluid; the serum is then 1:4 diluted.
- Dilute the supernatant fluid 1:10 with the **BUF** reagent to obtain a 1:40 adsorbed stock dilution.
- Follow the protocol of "Test execution on microplate" by replacing the stock dilution by the adsorbed stock dilution.

INTERNAL QUALITY CONTROL:

- Each **ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ®** kit includes **CONTROL -** and **ltered CONTROL+**. They are ready-to-use and have to be run as the samples. They validate the test. The **CONTROL+** titer must be equal to ± one dilution from the one mentioned on the vial label. No haemagglutination must be observed with the **CONTROL -**. If not, the test is not valid.
- The serum control must give a negative reaction (ring). In case of haemagglutination of this control, it is necessary to repeat the test after elimination of natural anti-sheep agglutinins by adsorption.
- The reagent control must give a negative reaction (ring). In case of haemagglutination of this control, **ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ®** reagent could not be used.

READING OF RESULTS:	NO HAEMAGGLUTINATION Presence of a more or less wide ring in well bottom.	NEGATIVE REACTION
	HAEMAGGLUTINATION Presence of a reddish-brown film in well bottom; sometimes, presence of a thin peripheral ring.	POSITIVE REACTION

Haemagglutination picture, obtained with a 1:1280 positive serum, is presented in annex.

The titer is given by the first dilution showing a wide peripheral ring.

- Notes :
- In case of positive reaction in the first 6 wells, make higher dilutions to determine the limit haemagglutination titer.
 - Some sera, with very high antibodies titer, may give zone phenomenon (with film retraction) at the first dilutions, which disappears at increasing dilutions.
 - The quality of the reagents allows the performance of the reaction in the evening, with reading the next morning, providing the microplate remains motionless and protected from vibrations.

INTERPRETATION OF THE RESULTS:

TITER < 1:160	Non significant reaction. Probable absence of echinococcosis. Repeat the test 2 or 3 weeks later and associate a counter-immunoelectrophoresis or an immunoelectrophoresis.
TITER = 1:160	Equivocal reaction. Repeat the test 2 or 3 weeks later and associate a counter-immunoelectrophoresis or an immunoelectrophoresis.
TITER ≥ 1:320	Significant reaction in favour of acute echinococcosis.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

Echinococcosis disease development is often slow and not very symptomatic. Therefore, the sero-diagnosis is of high interest. The **ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ®** reagent is composed of red blood cells sensitized with an *Echinococcus granulosus* antigen. It ensures sensibility and specificity to the reaction. A study of 221 human sera has shown a sensitivity of 93.0 % (whichever cyst location) and a specificity of 94.9 %. Comparative study with IFI and with ELISA test has shown the complementarity of these various test (2). In any case, diagnosis should be made using the results of this test together with the other clinical, epidemiological and laboratory findings.

de ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ®

SEROLOGISCHER ECHINOKOKKOSE-NACHWEIS DURCH INDIREKTE HÄMAGGLUTINATION

VERWENDUNGSZWECK:

ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ® ist ein indirekter Hämagglutinationstest zur quantitativen Bestimmung von anti-*Echinococcus granulosus*-Antikörpern in Serumproben.

TESTPRINZIP:

Der **ECHINOCOCCOSIS FUMOUCZ®** Test basiert auf einer indirekten Hämagglutination. Sensibilisierte Schafserthrozyten sind mit *Echinococcus granulosus*-Antigen beschichtet. Sind in dem zu testenden Serum *Echinococcus granulosus*-Antikörper vorhanden, findet eine Agglutination der sensibilisierten roten Blutkörperchen statt: in der entsprechenden Kavität lässt sich ein rötlich-brauner Belag beobachten. In Abwesenheit spezifischer Antikörper sedimentieren die Erythrozyten ringförmig auf dem Boden der Kavität. Ein paralleler Testansatz mit nicht-sensibilisierten Erythrozyten stellt die Spezifität der Reaktion sicher und erlaubt den Ausschluss von Störungen des Tests durch natürliche anti-Schaf-Agglutinine (Forssman-Heteroantikörper, Antikörper gegen infektiöse Mononukleose ...). Die Reaktion wird in U-förmigen Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Test lässt sich schnell und einfach durchführen, die Ergebnisse liegen nach 2 Stunden vor.

BESTANDTEILE DES KITS:

- R1**: 1 Fläschchen von 2,2 mL sensibilisierte rote Blutkörperchen
- BUF**: 1 Fläschchen von 55 mL Phosphatpuffer-Lösung, pH 7,2
- CONTROL +**: 1 Fläschchen von 0,2 mL, titrierte Positivkontrolle
- MICROPLATE**: 2 Mikrotiterplatten (u-förmig)
- R2**: 1 Fläschchen von 1 mL nicht-sensibilisierte rote Blutkörperchen
- R3**: 1 Fläschchen von 2 mL Adsorbens
- CONTROL -**: 1 Fläschchen von 0,2 mL Negativkontrolle
- DROPPER**: 2 Spezial-Dropper

Hinweise: - Es dürfen ausschließlich nur die zum Kit zugehörigen Dropper verwendet werden.
- Die Dropper von **R1** und **R2** Reagenzien dürfen nicht miteinander vertauscht werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN):

- Mehrkanal-Mikropipette zum Pipettieren von 50 µL
- Mikropipetten zum Pipettieren von 50 µL sowie 100-1000 µL
- Behälter für kontaminierten Abfall
- Hämolyseröhrchen
- Zentrifuge

LAGERUNGSBEDINGUNGEN:

Reagenzien sind gebrauchsfertig. Lagerung bei +2 ...+8°C bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum. Nicht einfrieren.

PROBENTENNAHME / HANDHABUNG / LAGERUNG:

Frisch entnommenes Serum einsetzen. Die Serumproben können für einen Zeitraum von 72 Stunden bei +2° ... +8°C gelagert werden. Werden sie nicht innerhalb von 72 Stunden nach ihrer Gewinnung in den Test eingesetzt, müssen sie eingefroren (-20°C) werden. Um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, sollten die Proben dafür aliquotiert werden. Keine Wärme-Vorbehandlung des Serums durchführen. Es darf kein hämolyisiertes, trübes oder kontaminiertes Serum eingesetzt werden.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN:

- Nur zur in vitro-Diagnostik und zur Testdurchführung durch qualifiziertes Labpersonal. Tests nur zum Einmal-Gebrauch.
- Reagenzien und Kontrollen unterschiedlicher Chargen dürfen nicht untereinander ausgetauscht werden.
- Die Anweisungen zur Testdurchführung müssen genau befolgt werden.
- Alle Reagenzien und Proben sollten vor Einsatz in den Test Raumtemperatur bringen.
- Erythrozytensuspensionen vor Einsatz in den Test sorgfältig mischen.
- Halten Sie die Dropper-Nadel beim Verteilen der Erythrozytensuspension senkrecht. Sorgen Sie dafür, dass die Tropfen luftblasenfrei sind, da nur dann ein konstantes Volumen gewährleistet ist.
- Falls versehentlich Reagent verspritzt sollte, betreffende Oberfläche mit saugfähigem Papier und Wasser reinigen. Bei Serumspritzern betroffene Stelle mit saugfähigem Papier und 10% iger Natriumhypochlorit-Lösung reinigen.
- Reagenzkontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden, nicht verschlucken.
- Die Proben und Reagenzien sowie kontaminiertes Material und Produkte müssen gemäß den Empfehlungen und geltenden Sicherheitsbestimmungen in einen Behälter für kontaminierte Abfälle entsorgt werden.
- Die Reagenzien **CONTROL** enthalten < 0,1% Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohrleitungen zu hochempfindlichen Metallaziden reagieren kann. Diese Azidbildung kann vermieden werden, wenn bei der Entsorgung azidhaltiger Reagenzien mit großen Mengen Wasser nachgespült wird.
- Alle Reagenzien, außer der Phosphatpuffer-Lösung (**BUF**), enthalten Material tierischen Ursprungs. Sie müssen alle mit der gleichen Sorgfalt wie gefährliche Komponenten behandelt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Vor Einsatz in den Test sollten alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreicht haben.

- Herstellung der 1:40-Stammverdünnung des zu testenden Serums**
Folgendes in ein Hämolyseröhrchen pipettieren und mischen 50 µL Testserum und 1,95 mL Phosphatpuffer-Lösung (**BUF**).
 - Test auf Mikrotiterplatte**
 - Mit einer Mehrkanalmikropipette in 8 Kavitäten der Mikrotiterplatte 50 µL Phosphatpuffer-Lösung (**BUF**) pipettieren.
 - In die 1. Kavität 50 µL der Stammverdünnung zupipettieren. Serum und Puffer (**BUF**) in Kavität 1 gut mischen und 50 µL von der 1. in die 2. Kavität, von der 2. in die 3. Kavität usw. bis zur 6. Kavität pipettieren. Aus der 6. Kavität 50 µL entnehmen und verworfen. Folgende Verdünnungen liegen nun in den Kavitäten vor:
- | Kavität zahl (siehe Anhang) | Kavität I | Kavität II | Kavität III | Kavität IV | Kavität V | Kavität VI |
|-----------------------------|-----------|------------|-------------|------------|-----------|------------|
| Verdünnung | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 |
- In die 7. Kavität 50 µL der Serum-Stammverdünnung pipettieren. Mit dem Puffer (**BUF**) mischen und 50 µL entnehmen und verworfen. Diese 1:80-Verdünnung stellt die Serumkontrolle dar und dient dem Nachweis natürlicher anti-Schaf-Agglutinine, die in manchen Seren vorkommen können.
 - Erythrozytensuspensionen (**R1** und **R2**) sorgfältig mischen.
 - In die ersten 6 Kavitäten jeweils 1 Tropfen sensibilisierte Erythrozyten (**R1**) geben.
 - In die 7. Kavität 1 Tropfen nicht-sensibilisierte Erythrozyten (**R2**) geben (Serumkontrolle - Kavität VII - siehe Anhang).
 - In die 8. Kavität 1 Tropfen sensibilisierte Erythrozyten (**R1**) geben (Reagenzkontrolle - Kavität VIII - siehe Anhang). Dies dient der Richtigeitskontrolle von Puffer (**BUF**) und sensibilisierten Erythrozyten (**R1**). Hinweis: Pro Testserie sollte nur 1 Reagenzkontrolle angesetzt werden.
 - Inhalt der Kavitäten sehr sorgfältig homogenisieren:
 - entweder manuell durch seitliches Beklopfen der Mikrotiterplattenränder;
 - oder mit einem Vibrationschüttler für Mikrotiterplatten. Keine Schüttler mit kreisförmigen Bewegungen einsetzen.
 - Dann die Platte nicht mehr bewegen und frei von Vibrationen stehen lassen.
 - 2 Stunden später das Reaktionsergebnis ablesen.

ADSORPTION NATÜRLICHER ANTI-SCHAF-AGGLUTININE IM FALLE EINER AGGLUTINATION DER SERUMKONTROLLE:

- Folgendes in ein Röhrchen und mischen 0,1 mL Serum und 0,3 mL Adsorbens (**R3**).
- 60 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 15 min bei 800 g zentrifugieren.
- Flüssigen Überstand abnehmen ; das Serum ist nun 1:4 verdünnt.
- Den Überstand mit der Phosphatpuffer-Lös

