

## Instructions for Use

# Brucella IgA ELISA

IVD



REF EIA-3271

 96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drd-diagnostics.de](mailto:drg@drd-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drd-international.com](mailto:corp@drd-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.  
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION .....	3
3	TEST PRINCIPLE .....	3
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
5	STORAGE AND STABILITY .....	3
6	SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE.....	4
7	MATERIALS SUPPLIED .....	4
8	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	4
9	PROCEDURE NOTES .....	5
10	PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS.....	5
11	TEST PROCEDURE .....	6
12	QUALITY CONTROL .....	6
13	CALCULATION OF RESULTS.....	6
14	INTERPRETATION OF RESULTS.....	7
15	EXPECTED VALUES.....	7
16	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....	7
17	PERFORMANCE .....	7
1	ZWECKBESTIMMUNG .....	8
2	KLINISCHE BEDEUTUNG .....	8
3	TESTPRINZIP .....	8
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN .....	8
5	LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	9
6	PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.....	9
7	KOMPONENTEN DES KITS.....	9
8	ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN) .....	9
9	HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG .....	10
10	TESTVORBEREITUNGEN .....	10
11	TESTDURCHFÜHRUNG .....	11
12	QUALITÄTSKONTROLLE.....	11
13	TESTAUSWERTUNG .....	11
14	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE .....	12
15	NORMWERTE .....	12
16	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	12
17	TESTCHARAKTERISTIKA.....	12

1	USO PREVISTO .....	13
2	SOMMARIO E SPIEGAZIONI .....	13
3	PRINCIPIO DEL TEST .....	13
4	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	13
5	CONSERVAZIONE E STABILITÀ.....	14
6	PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI .....	14
7	MATERIALE FORNITO.....	14
8	MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI .....	14
9	NOTE PER LA PROCEDURA.....	15
10	ISTRUZIONI PRE-TEST .....	15
11	PROCEDURA DEL TEST .....	16
12	CONTROLLO DI QUALITÀ .....	16
13	CALCOLO DEI RISULTATI.....	16
14	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI .....	17
15	VALORI ATTESI.....	17
16	LIMITI DELLA PROCEDURA.....	17
17	PERFORMANCE .....	17
18	PRODUCT LITERATURE REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA .....	18
	SYMBOLS USED.....	19

## 1 INTENDED USE

Enzyme immunoassays (microtiter strips) for the qualitative and quantitative determination of IgA antibodies against Brucella in human serum and plasma.

## 2 SUMMARY AND EXPLANATION

Brucellosis is an infectious disease caused by small ellipsoid, gram-negative bacteria. There are four different germs: *Br. abortus*, *Br. melitensis*, *Br. suis* and *Br. canis*. People are infected by contact with infected animals or by swallowing meat or unpasteurized milk from infected animals. Infected humans are not contagious. The incubation period may take one to three weeks, in some cases two months. *Br. abortus* and *Br. melitensis* cause Bang's Disease, and rarely the Malta Fever. Typical symptoms for Bang's Disease are periodically occurring fever, splenomegaly and swelling of lymph nodes. In some cases an inflammation of different joints and organs occurs. Malta Fever is caused by the epidemic type of brucellosis. Infection almost always leads to a manifest illness. Brucella also can cause Brucella Hepatitis. In addition, it is possible that there is a link between an infection with Brucella and the outbreak of multiple sclerosis.

During an antibiotic therapy or a chronic infection, the detection of *Brucella spec.* in blood, urine, cerebrospinal fluid, sputum or other body fluids may be negative. Serological methods like agglutination, complement fixation reaction, Brucella Coombs test and ELISA are good alternatives. To monitor the status of infection antibodies can serve as a usual indication. During the first days, IgM is the only immunoglobulin appearing. As the disease progresses, IgM recedes quantitatively and IgG becomes predominant. In chronic brucellosis IgM may be produced for extended periods.

## 3 TEST PRINCIPLE

Solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle. The wells are coated with antigen. Specific antibodies of the sample binding to the antigen coated wells are detected by a secondary enzyme conjugated antibody (E-Ab) specific for human IgA. After the substrate reaction the intensity of the color developed is proportional to the amount of IgA-specific antibodies detected. Results of samples can be determined directly using the standard curve.

## 4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For *in-vitro diagnostic* use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. In case of severe damage of the kit package please contact your supplier in written form, latest one week after receiving the kit. Do not use damaged components in test runs, but keep safe for complaint related issues.
4. Obey lot number and expiry date. Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.
5. Follow good laboratory practice and safety guidelines. Wear lab coats, disposable latex gloves and protective glasses where necessary.
6. Reagents of this kit containing hazardous material may cause eye and skin irritations. See MATERIALS SUPPLIED and labels for details. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request.
7. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
8. The cleaning staff should be guided by the professionals regarding potential hazards and handling.
9. Avoid contact with Stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. Some reagents contain sodium azide (NaN<sub>3</sub>) as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water. NaN<sub>3</sub> may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. When disposing reagents, flush with a large volume of water to avoid azide build-up.
11. All reagents of this kit containing human serum or plasma have been tested and were found negative for anti-HIV I/II, HBsAg and anti-HCV. However, a presence of these or other infectious agents cannot be excluded absolutely. For this reason reagents should be treated as potential biohazards in use and for disposal.

## 5 STORAGE AND STABILITY

The kit is shipped at ambient temperature and should be stored at 2 °C - 8 °C. Keep away from heat or direct sunlight. The storage and stability of specimens and prepared reagents is stated in the corresponding chapters.

The unopened reagents are stable until the expiry date indicated. The Kit is stable up to 3 months after the first opening when the Microtiterplate is packed in a tightly closed bag, the bottles are closed with their screw caps and the kit is stored at 2 °C - 8 °C.

**6 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE****Serum, Plasma (EDTA, Heparin)**

The usual precautions for venipuncture should be observed. It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use grossly hemolytic, icteric or grossly lipemic specimens. Samples appearing turbid should be centrifuged before testing to remove any particulate material.

Storage:	2 °C - 8 °C	-20 °C	Keep away from heat or direct sunlight. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Stability:	7 days	> 7 days	

**7 MATERIALS SUPPLIED**

Quantity	Symbol	Component
1 x 12 x 8	<b>MTP</b>	<b>Microtiter Plate</b> Break apart strips. Coated with specific antigen.
1 x 15 mL	<b>ENZCONJ IgA</b>	<b>Enzyme Conjugate IgA</b> Red colored. Ready to use. Contains: anti-human IgA, conjugated to peroxidase (rabbit), protein-containing buffer, 0.01 % Methylisothiazolinone, 0.01 % Bromonitrodioxane and 5 mg/L ProClin.
1 x 4 x 2 mL	<b>CAL A-D</b>	<b>Standard A-D</b> 1; 10; 50; 200 U/mL. Ready to use. Standard A = Negative Control Standard B = Cut-Off Control Standard C = Weakly Positive Control Standard D = Positive Control Contains Human serum with IgA antibodies against Brucella, PBS, 0.01 % Methylisothiazolinone and 0.01 % Bromonitrodioxane.
1 x 60 mL	<b>DILBUF</b>	<b>Diluent Buffer</b> Ready to use. Contains: PBS Buffer, BSA, < 0.1 % NaN <sub>3</sub> .
1 x 60 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	<b>Wash Buffer, Concentrate (10x)</b> Contains: PBS Buffer, Tween 20.
1 x 15 mL	<b>TMB SUBS</b>	<b>TMB Substrate Solution</b> Ready to use. Contains: TMB.
1 x 15 mL	<b>TMB STOP</b>	<b>TMB Stop Solution</b> Ready to use. 0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
2 x	<b>FOIL</b>	<b>Adhesive Foil</b> For covering of Microtiter Plate during incubation.
1 x	<b>BAG</b>	<b>Plastic Bag</b> Resealable. For dry storage of non-used strips.

**8 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**

1. Micropipettes (Multipette Eppendorf or similar devices, < 3 % CV). Volumes: 5; 50; 100; 500 µL
2. Calibrated measures
3. Tubes (1 mL) for sample dilution
4. 8-Channel Micropipettor with reagent reservoirs
5. Wash bottle, automated or semi-automated microtiter plate washing system
6. Microtiter plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (reference wavelength 600-650 nm)
7. Bidistilled or deionised water
8. Paper towels, pipette tips and timer

**9 PROCEDURE NOTES**

1. Any improper handling of samples or modification of the test procedure may influence the results. The indicated pipetting volumes, incubation times, temperatures and pretreatment steps have to be performed strictly according to the instructions. Use calibrated pipettes and devices only.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time. Allow all reagents and specimens to reach room temperature (18 °C - 25 °C) and gently swirl each vial of liquid reagent and sample before use. Mix reagents without foaming.
3. Avoid contamination of reagents, pipettes and wells/tubes. Use new disposable plastic pipette tips for each component and specimen. Do not interchange caps. Always cap not used vials. Do not reuse wells/tubes or reagents.
4. Use a pipetting scheme to verify an appropriate plate layout.
5. Incubation time affects results. All wells should be handled in the same order and time sequences. It is recommended to use an 8-channel Micropipettor for pipetting of solutions in all wells.
6. Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with Wash Buffer, and that there are no residues in the wells.
7. Humidity affects the coated wells/tubes. Do not open the pouch until it reaches room temperature. Unused wells/tubes should be returned immediately to the resealed pouch including the desiccant.

**10 PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS**

- **Preparation of Components**



The contents of the kit for 96 determinations can be divided into 3 separate runs.

The volumes stated below are for one run with 4 strips (32 determinations).

Dilute / dissolve	Component		Diluent	Relation	Remarks	Storage	Stability
20 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	180 mL	bidist. water	1:10	Warm up at 37 °C to dissolve crystals, if necessary. Mix vigorously.	2 °C - 8 °C	8 weeks

- **Dilution of Samples**

Sample	to be diluted	with	Relation	Remarks
<b>Serum / Plasma</b>	generally	DILBUF	1:101	e.g. 5 µL + 500 µL DILBUF

Samples containing concentrations higher than the highest standard have to be diluted further.

## 11 TEST PROCEDURE

1. Pipette **100 µL** of each **Standard and diluted sample** into the respective wells of the Microtiter Plate. In the qualitative test only Standard B is used.
2. Cover plate with adhesive foil. Incubate **60 min** at **18 °C - 25 °C**.
3. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate **3 x** with **300 µL** of **diluted Wash Buffer**. Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
4. Pipette **100 µL** of **Enzyme Conjugate** into each well.
5. Cover plate with new adhesive foil. **Incubate 30 min** at **18 °C - 25 °C**.
6. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate **3 x** with **300 µL** of **diluted Wash Buffer**. Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
7. For adding of Substrate and Stop Solution use, if available, an 8-channel Micropipettor. Pipetting should be carried out in the same time intervals for Substrate and Stop Solution. Use positive displacement and avoid formation of air bubbles.
8. Pipette **100 µL** of **TMB Substrate Solution** into each well.
9. Incubate **20 min** at **18 °C - 25 °C** in the dark (without adhesive foil).
10. Stop the substrate reaction by adding **100 µL** of **TMB Stop Solution** into each well. Briefly mix contents by gently shaking the plate. Color changes from blue to yellow.
11. **Measure** optical density with a photometer at **450 nm** (Reference-wavelength: 600-650 nm) within **60 min** after pipetting of the Stop Solution.

## 12 QUALITY CONTROL

The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or comparable standards /laws. User and/or laboratory must have a validated system to get diagnosis according to GLP. All standards/controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls. It is recommended to participate at appropriate quality assessment trials. In case of any deviation the following technical issues should be proven: Expiration dates of (prepared) reagents, storage conditions, pipettes, devices, incubation conditions and washing methods.

## 13 CALCULATION OF RESULTS

The evaluation of the test can be performed either quantitatively or qualitatively.

### ○ Qualitative Evaluation

The Cut-off value is given by the optical density (OD) of the Standard B (Cut-off standard). The Cut-off index (COI) is calculated from the mean optical densities of the sample and Cut-off value. If the optical density of the sample is within a range of 20 % around the Cut-off value (grey zone), the sample has to be considered as borderline. Samples with higher ODs are positive, samples with lower ODs are negative.

For a quantification, the Cut-off index (COI) of the samples can be formed as follows:

$$\text{COI} = \frac{\text{OD Sample}}{\text{OD Standard B}}$$

### 13.1 Quantitative Evaluation

The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic graph paper or using an automated method. A good fit is provided with cubic spline or point-to-point curve, because these methods give the highest accuracy in the data calculation.

For the calculation of the standard curve, apply each signal of the standards (one obvious outlier of duplicates might be omitted and the more plausible single value might be used).

The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.

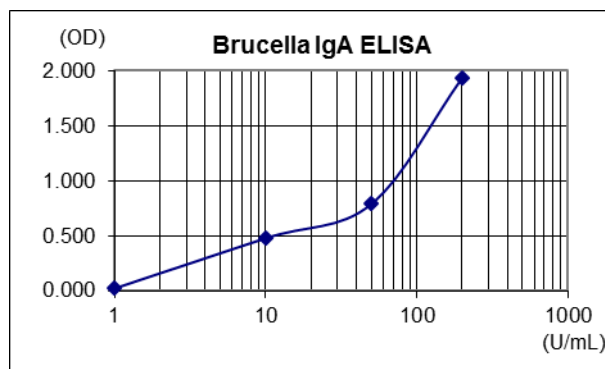
The initial dilution has been taken into consideration when reading the results from the graph. Results of samples of higher predilution have to be multiplied with the dilution factor.

Samples showing concentrations above the highest standard have to be diluted as described in PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS and reassayed.

**Typical Calibration Curve**

(Example. Do not use for calculation!)

Standard	U/mL	OD <sub>Mean</sub>
A	1	0.022
B	10	0.479
C	50	0.789
D	200	1.936



**– INTERPRETATION OF RESULTS**

Method	Range	Interpretation
Quantitative (Standard curve)	< 8 U/mL	negative
	8 – 12 U/mL	equivocal
	> 12 U/mL	positive
Qualitative (Cut-off Index, COI)	< 0.8	negative
	0.8 – 1.2	equivocal
	> 1.2	positive

The results themselves should not be the only reason for any therapeutical consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

**– EXPECTED VALUES**

In an in-house study, apparently healthy subjects showed the following results:

Ig Isotype	n	Interpretation		
		positive	equivocal	negative
IgA	88	1.1 %	3.4 %	95.5 %

**– LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

Specimen collection and storage have a significant effect on the test results. See SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE for details.

Azide and thimerosal at concentrations > 0.1 % interfere in this assay and may lead to false results.

The following blood components do not have a significant effect (+/- 20 % of expected) on the test results up to the below stated concentrations:

Hemoglobin	8.0 mg/mL
Bilirubin	0.3 mg/mL
Triglyceride	5.0 mg/mL

**14 PERFORMANCE**

<b>Intra-Assay Precision</b>	9.3 %
<b>Inter-Assay Precision</b>	8.4 %
<b>Inter-Lot Precision</b>	4.4 – 10.5 %
<b>Analytical Sensitivity</b>	1.14 U/mL
<b>Recovery</b>	92 – 114 %
<b>Linearity</b>	69 – 110 %
<b>Cross Reactivity</b>	No cross-reactivities were found to: Bordetella pertussis
<b>Clinical specificity</b>	100 %
<b>Clinical sensitivity</b>	100 %



## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Enzymimmunoassays (Mikrotiterstreifen) zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von IgA Antikörpern gegen Brucella in humanem Serum und Plasma.

## 15 KLINISCHE BEDEUTUNG

Die Brucellose wird durch kleine ellipsoide, gramnegative Bakterien verursacht. Man unterscheidet zwischen vier Erregern, *Br. abortus*, *Br. melitensis*, *Br. suis* und *Br. canis*. Ansteckungsgefahr für den Menschen besteht beim Genuß unpasteurisierter Milch von infizierten Tieren oder deren Fleisch. Allein schon der Umgang mit infizierten Tieren kann zu einer Infektion führen. Die beim Menschen hervorgerufene Krankheit wird als undulierendes Fieber oder Bangsche Erkrankung bezeichnet (*Br. abortus*, *Br. melitensis*). Seltener tritt das Maltafieber auf. Bei der Bangschen Krankheit handelt es sich um ein periodisch wiederkehrendes Fieber. Parallel dazu sind eine Splenomegalie und eine Lymphknotenschwellung zu beobachten. Es können auch Entzündungen auftreten, die verschiedene Gelenke und auch Organe befallen. In wenigen Fällen ist auch eine Brucella-Hepatitis zu beobachten. Es werden sogar Zusammenhänge zwischen einer Brucellainfektion und einer später auftretenden Multiple Sklerose-Erkrankung vermutet.

Die Diagnose kann durch den Direktnachweis des Erregers im Blut, Urin, Liquor, Sputum und anderen Körperflüssigkeiten geführt werden. Jedoch kann der Nachweis bei einer begonnenen Antibiotikabehandlung oder einem chronischen Verlauf oft negativ sein. Als Alternativen bieten sich serologische Nachweismethoden wie die Agglutination, Komplementbindungsreaktion, Brucella-Coombtest und der ELISA an. Während IgM-Antikörper nur in der akuten Phase nachweisbar sind, können IgG-Antikörper bei einer chronischen Brucellose lange persistieren.

## 16 TESTPRINZIP

Sandwich-Enzymimmunoassay (ELISA). Die Wells der Mikrotiterstreifen sind mit Antigen beschichtet. Die spezifischen Antikörper der Probe binden an die Antigen-beschichteten Wells und werden von einem zweiten enzymmarkierten Antikörper (E-Ab), der gegen humanes IgA gerichtet ist, detektiert. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist proportional zur IgA-Konzentration. Die Ergebnisse der Proben können direkt anhand der Standardkurve bestimmt werden.

## 17 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Nur zum *In-vitro-Gebrauch*. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
2. Vor der Testdurchführung sollte die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Im Falle einer erheblichen Beschädigung der Testpackung ist der jeweilige Lieferant innerhalb einer Woche nach Empfang der Ware schriftlich zu benachrichtigen. Beschädigte Komponenten dürfen nicht zur Testdurchführung verwendet werden, sondern sollten solange aufbewahrt werden, bis der Transportschaden endgültig geregelt ist.
4. Chargen-Nummer und Verfallsdatum beachten. Es dürfen keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen in einem Test verwendet werden. Verfallene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
5. Gute Laborpraxis und Sicherheitsrichtlinien beachten. Je nach Bedarf sollten Laborkittel, Einmal-Latexhandschuhe und Schutzbrillen getragen werden.
6. Reagenzien dieses Kits, die Gefahrstoffe enthalten, können Reizungen der Augen und der Haut hervorrufen. Siehe Angaben in KOMPONENTEN DES KITS und auf den Etiketten. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage erhältlich.
7. Chemikalien und vorbereitete oder gebrauchte Reagenzien sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Bestimmungen als Gefahrstoffabfall zu entsorgen.
8. Das Reinigungspersonal ist durch das Fachpersonal bezüglich möglicher Gefahren und Umgang anzuleiten.
9. Kontakt mit Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verätzungen hervorrufen.
10. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit den Augen oder der Haut gründlich mit Wasser abspülen.  $\text{NaN}_3$  kann mit Blei und Kupfer explosive Azide bilden. Bei Entsorgung über das Abwasser gut spülen, um Azidanreicherung zu vermeiden.
11. Alle Reagenzien dieses Kits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, ergaben bei der Prüfung auf anti-HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

**18 LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur angeliefert und sollte bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Hinweise zur Lagerung und Haltbarkeit der Proben und vorbereiteten Reagenzien sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

Alle in der Packung enthaltenen Komponenten sind ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Der Kit ist nach dem Öffnen der Verpackung 3 Monate haltbar, wenn die Mikrotiterplatte wieder verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und der Kit bei 2 °C - 8 °C gelagert wird.

**19 PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG****Serum, Plasma (EDTA, Heparin)**

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Blutabnahme sind einzuhalten. Die chemische Integrität der Blutproben muss vom Zeitpunkt der Blutabnahme bis zur Testdurchführung erhalten bleiben. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Getrübte Proben sollten vor der Testdurchführung zentrifugiert werden, um Partikel zu entfernen.

Lagerung:	2 °C - 8 °C	-20 °C	Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit:	7 Tage	> 7 Tage	

**20 KOMPONENTEN DES KITS**

Anzahl / Menge	Symbol	Komponente
1 x 12 x 8	<b>MTP</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> Streifen einzeln abbrechbar. Beschichtet mit spezifischem Antigen.
1 x 15 mL	<b>ENZCONJ IgA</b>	<b>Enzymkonjugat IgA</b> Rot gefärbt. Gebrauchsfertig. Enthält: anti-humanes IgA, konjugiert mit Peroxidase (Kaninchen), Protein-Puffer, 0.01 % Methylisothiazolinon, 0.01 % Bromonitrodioxane und 5 mg/L ProClin.
1 x 4 x 2 mL	<b>CAL A-D</b>	<b>Standard A-D</b> 1; 10; 50; 200 U/mL. Gebrauchsfertig. Standard A = Negativkontrolle    Standard B = Cut-Off Kontrolle Standard C = Schwach positive Kontrolle    Standard D = Positivkontrolle Enthält: Humanserum mit IgA Antikörper gegen Brucella, PBS, 0.01 % Methylisothiazolinon und 0.01 % Bromonitrodioxane.
1 x 60 mL	<b>DILBUF</b>	<b>Verdünnungspuffer</b> Gebrauchsfertig. Enthält: PBS Puffer, BSA, < 0.1 % NaN <sub>3</sub> .
1 x 60 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	<b>Waschpuffer, Konzentrat (10x)</b> Enthält: PBS Puffer, Tween 20.
1 x 15 mL	<b>TMB SUBS</b>	<b>TMB Substratlösung</b> Gebrauchsfertig. Enthält: TMB.
1 x 15 mL	<b>TMB STOP</b>	<b>TMB Stopplösung</b> Gebrauchsfertig. 0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
2 x	<b>FOIL</b>	<b>Haftklebefolie</b> Zur Abdeckung der Mikrotiterplatte während der Inkubation.
1 x	<b>BAG</b>	<b>Plastikbeutel</b> Wiederverschließbar. Zur Aufbewahrung der nicht gebrauchten Streifen.

**21 ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)**

1. Mikropipetten (Multipette Eppendorf oder ähnliche, < 3 % VK). Volumina: 5; 50; 100; 500 µL
2. Messzylinder
3. Röhrchen (1 mL) zur Probenverdünnung
4. 8-Kanal Mikropipette mit Reagenziengefäßen
5. Waschflasche, automatisches oder halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten
6. Messgerät für Mikrotiterplatten zur Messung der Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 600-650 nm)
7. Bidest. oder deionisiertes Wasser
8. Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

**22 HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG**

1. Fehler bei der Handhabung der Proben oder Abweichungen von der beschriebenen Testdurchführung können die Ergebnisse verfälschen. Die angegebenen Pipettierolumina, Inkubationszeiten, Temperaturen und Vorbereitungsschritte sind unbedingt gemäß Arbeitsanleitung einzuhalten. Nur kalibrierte Pipetten und Geräte verwenden.
2. Sobald mit der Testdurchführung begonnen wird, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden. Es ist sicherzustellen, dass alle benötigten Reagenzien, Geräte und Hilfsmittel zur rechten Zeit zur Verfügung stehen. Alle Reagenzien und Proben müssen auf Raumtemperatur (18-25 °C) gebracht und vor Gebrauch vorsichtig ohne Schaumbildung gemischt werden.
3. Kontaminationen der Reagenzien, Pipetten und Wells/Röhrchen sind zu vermeiden. Neue Einmal-Pipettenspitzen für jede zu pipettierende Komponente und jede Probe verwenden. Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen. Nicht benötigte Fläschchen immer verschlossen halten. Wells/Röhrchen oder Reagenzien dürfen nicht wiederverwendet werden.
4. Es sollte ein Pipettierschema verwendet werden um die Identifikation der Standards und Proben auf der Platte sicherzustellen.
5. Die Inkubationszeiten beeinflussen die Ergebnisse. Bei jedem Pipettierschritt sollten alle Wells in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeittakt behandelt werden. Die Verwendung einer 8-Kanal-Mikropipette zum Pipettieren in alle Wells wird empfohlen.
6. Die korrekte Durchführung der Waschschrte ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette oder eines automatischen Waschsystems für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschpuffer gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
7. Feuchtigkeit beeinflusst die beschichteten Wells/Röhrchen. Verpackung nicht öffnen bevor Raumtemperatur erreicht ist. Nicht benötigte Wells/Röhrchen sofort in den wieder verschließbaren Beutel mit Trockenmittel zurückgeben.

**23 TESTVORBEREITUNGEN**○ **Vorbereitung der Komponenten**

Der Inhalt des Kits für 96 Bestimmungen kann in 3 Läufe aufgeteilt werden.  
Die unten angegebenen Volumina sind für einen Lauf mit 4 Streifen (32 Bestimmungen).

Verd. / rekonst.	Komponente		Diluent	Verhältnis	Bemerkungen	Lagerung	Haltbarkeit
20 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	180 mL	bidest. Wasser	1:10	Ggf. auf 37 °C erwärmen, um Kristalle aufzulösen. Gründlich mischen.	2 °C - 8 °C	8 w

○ **Probenverdünnung**

Probe	zu verdünnen	mit	Verhältnis	Bemerkungen
<b>Serum / Plasma</b>	immer	DILBUF	1:101	z.B. 5 µL + 500 µL DILBUF

Proben mit Konzentrationen über dem höchsten Standard müssen weiter verdünnt werden.

## 24 TESTDURCHFÜHRUNG

1. Je **100 µL** von jedem **Standard** und jeder **verdünnten Probe** in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte pipettieren. Im qualitativen Assay wird nur Standard B verwendet.
12. Platte mit Haftklebefolie abdecken. **60 min** bei **18 °C - 25 °C** inkubieren.
13. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte **3 x** mit je **300 µL verdünntem Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
14. **100 µL Enzymkonjugat** in jedes Well pipettieren.
15. Platte mit neuer Folie abdecken. **30 min** bei **18 °C - 25 °C** inkubieren.
16. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte **3 x** mit je **300 µL verdünntem Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
17. Substrat- und Stopplösung möglichst mit einer 8-Kanal-Pipette pipettieren und Substrat- und Stopplösung in denselben Zeitintervallen zugeben. Mit positivem Vorhub pipettieren, um die Bildung von Luftbläschen zu vermeiden.
18. **100 µL TMB Substratlösung** in jedes Well pipettieren.
19. **20 min** bei **18 °C - 25 °C** im Dunkeln inkubieren. (Ohne Haftklebefolie.)
20. Die Substratreaktion durch Zugabe von **100 µL TMB Stopplösung** in jedes Well stoppen. Platte kurz schütteln. Die Farbe wechselt von blau nach gelb.
21. Die optische Dichte mit einem Photometer innerhalb von **60 min** nach Zugabe der Stopplösung bei **450 nm messen** (Referenzwellenlänge: 600-650 nm).

## 25 QUALITÄTSKONTROLLE

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn der Test gemäß der vorliegenden Arbeitsanleitung abgearbeitet wurde. Ferner muss der Anwender die GLP-Regeln (Good Laboratory Practice) oder vergleichbare Normen/Gesetze beachten. Anwender und/oder Labor müssen zur Diagnosestellung ein gemäß GLP validiertes System verwenden. Alle Standards/Kontrollen des Kits müssen innerhalb der Akzeptanzbereiche, die auf dem QC-Zertifikat angegeben sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, sind die Ergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden. Jedes Labor sollte darüber hinaus eigene bekannte Proben als weitere Kontrollen mitführen. Es wird empfohlen, an den einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Bei Abweichungen sind die folgenden Fehlermöglichkeiten zu überprüfen: Haltbarkeit der (vorbereiteten) Reagenzien, Lagerungsbedingungen, Pipetten, Geräte und Hilfsmittel, Inkubationsbedingungen und Waschmethoden.

## 26 TESTAUSWERTUNG

Die Testauswertung kann wahlweise qualitativ oder quantitativ erfolgen.

### 1. Qualitative Auswertung

Der Cut-off Wert ergibt sich aus der optischen Dichte (OD) des Standards B (Cut-off Standard). Der Cut-off Index (COI) wird aus der mittleren optischen Dichte der Probe und der des Cut-offs berechnet. Proben, deren optische Dichte sich nicht mehr als 20 % (Graubereich) von der des Cut-off Wertes unterscheidet, sind als grenzwertig zu beurteilen. Darüberliegende Proben sind positiv, darunterliegende negativ zu bewerten.

Der Cut-off Index (COI) der Proben wird wie folgt bestimmt:

$$\text{COI} = \frac{\text{OD Probe}}{\text{OD Standard B}}$$

### o Quantitative Auswertung

Die erhaltenen OD der Standards (y-Achse, linear) gegen deren Konzentration (x-Achse, logarithmisch) auftragen, entweder auf semi-logarithmischem Papier oder durch ein entsprechendes Computerprogramm. Bei Verwendung eines Computerprogramms werden die Methoden „Cubic-Spline“ oder „Punkt-zu-Punkt“ empfohlen, da diese gegenüber anderen Auswertemodellen die höchste Genauigkeit bei der Messdatenauswertung liefern.

Zur Berechnung der Standardkurve sollten alle Werte der Standards verwendet werden (bei Doppelwerten kann ein offensichtlicher Ausreißerwert eliminiert und stattdessen der plausible Einzelwert verwendet werden).

Die Konzentrationen der Proben können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

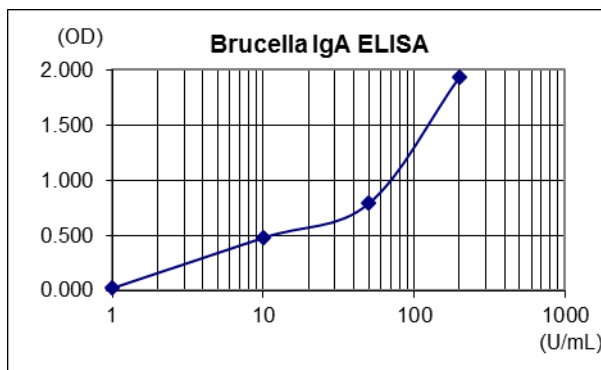
Die standardmäßig durchzuführende Verdünnung ist in dem oben beschriebenen Auswerteverfahren bereits berücksichtigt. Wenn Proben anders oder weiter verdünnt wurden, müssen die Ergebnisse mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen werden, müssen wie in TESTVORBEREITUNGEN beschrieben verdünnt und erneut analysiert werden.

**Typische Standardkurve**

(Beispiel. Nicht zur Testauswertung verwenden!)

Standard	U/mL	OD <sub>Mittelwert</sub>
A	1	0,022
B	10	0,479
C	50	0,789
D	200	1,936



**– INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

Methode	Bereich	Interpretation
Quantitativ (Standardkurve)	< 8 U/mL	negativ
	8 – 12 U/mL	grenzwertig
	> 12 U/mL	positiv
Qualitativ (Cut-off Index, COI)	< 0,8	negativ
	0,8 – 1,2	grenzwertig
	> 1,2	positiv

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein aufgrund der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern nur unter Berücksichtigung aller klinischen Beobachtungen und weiterer diagnostischer Mittel.

**27 NORMWERTE**

In einer eigenen Studie zeigten offensichtlich gesunde Probanden die folgenden Ergebnisse:

Ig-Isotyp	n	Interpretation		
		positiv	grenzwertig	negativ
<b>IgA</b>	88	1,1 %	3,4 %	95,5 %

**28 GRENZEN DES VERFAHRENS**

Die korrekte Durchführung der Probengewinnung und Aufbewahrung ist entscheidend für die Testergebnisse. Näheres siehe PROBENGWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.

Azid und Thimerosal in Konzentrationen > 0.1 % stören im Assay und führen evtl. zu falschen Ergebnissen.

Die folgenden Blutbestandteile haben bis zu der angegebenen Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse (+/-20 %):

Hämoglobin	8,0 mg/mL
Bilirubin	0,3 mg/mL
Triglyceride	5,0 mg/mL

**29 TESTCHARAKTERISTIKA**

<b>Intra-Assay Präzision</b>	9,3 %
<b>Inter-Assay Präzision</b>	8,4 %
<b>Inter-Lot Präzision</b>	4,4 – 10,5 %
<b>Analytische Sensitivität</b>	1,14 U/mL
<b>Wiederfindung</b>	92 – 114 %
<b>Linearität</b>	69 – 110 %
<b>Kreuzreaktivität</b>	Es wurden keine Kreuzreaktionen gefunden gegen: Bordetella pertussis
<b>Klinische Spezifität</b>	100 %
<b>Klinische Sensitivität</b>	100 %

## 1. USO PREVISTO

Saggio immunoenzimatico (strisce di micropiastra) per la determinazione qualitativa e quantitativa degli anticorpi della classe IgA per Brucella nel siero e plasma umani.

## 30 SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La brucellosi è una malattia infettiva causata da piccoli batteri Gram-negativi di forma ellissoidale. Vi sono quattro diversi batteri: *Br. abortus*, *Br. melitensis*, *Br. suis* e *Br. canis*. L'infezione avviene attraverso il contatto con animali infetti o l'ingestione di carne o di latte non pastorizzato provenienti da animali infetti. Gli esseri umani infetti non sono contagiosi. Il periodo d'incubazione può durare da una a tre settimane, talvolta due mesi. *Br. abortus* e *Br. melitensis* causano la malattia di Bang e raramente la febbre di Malta. I sintomi tipici della malattia di Bang sono febbre ricorrente periodica, splenomegalia e ingrossamento dei linfonodi. In alcuni casi si verifica infiammazione di diverse articolazioni e organi. La febbre di Malta è causata dalla brucellosi di tipo epidemico. L'infezione determina quasi sempre una malattia evidente. La Brucella può anche causare epatite da Brucella. Inoltre, è possibile che vi sia una correlazione tra un'infezione da Brucella e la comparsa di sclerosi multipla.

Durante una terapia antibiotica o un'infezione cronica, il rilevamento di *Brucella spp.* in sangue, urina, liquido cerebrospinale, sputo o altri liquidi corporei può risultare negativo. Buone alternative sono rappresentate da metodi sierologici come agglutinazione, reazione di fissazione del complemento, test di Coombs per la Brucella e test ELISA. Per monitorare lo stato dell'infezione si possono utilizzare gli anticorpi come indicazione abituale. Durante i primi giorni, le IgM sono le sole immunoglobuline che compaiono. Man mano che la malattia progredisce, le IgM diminuiscono quantitativamente mentre le IgG diventano predominanti. Nella brucellosi cronica le IgG possono essere prodotte per periodi prolungati.

## 31 PRINCIPIO DEL TEST

Test immunoenzimatico assorbente su fase solida (ELISA) basato sul principio sandwich. I pozzetti sono rivestiti con l'antigene. Anticorpi specifici del campione legano l'antigene di cui sono rivestiti i pozzetti e sono poi rilevati da un secondo anticorpo coniugato con l'enzima (E-Ab) specifico per IgA umane. Dopo la reazione con il substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla quantità di anticorpi IgA specifici rilevata. I risultati dei campioni possono essere determinati direttamente usando la curva standard.

## – AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Solo per uso *diagnostico in-vitro*. Solo per uso professionale.
2. Leggere attentamente le istruzioni prima di iniziare il test. Utilizzare il manuale fornito nel kit. Assicurarsi di aver compreso tutte le indicazioni.
3. In caso di danneggiamento del kit contattare DRG o il Vostro fornitore entro 1 settimana dal ricevimento della merce. Non utilizzare i componenti danneggiati ma conservarli per fornire prove del danno assieme al reclamo che inoltrerete al produttore/fornitore.
4. Rispettare lotto e scadenze. Non scambiare o mescolare tra loro reagenti di lotti diversi. Non usare i reagenti scaduti.
5. Attenersi alle Buone Pratiche di Laboratorio e alle direttive di sicurezza. Indossare camici, guanti in lattice e occhiali protettivi se necessario.
6. Alcuni reagenti del kit contengono sostanze pericolose che potrebbero causare irritazioni a pelle ed occhi. Consultare la sezione MATERIALE FORNITO e le etichette per i dettagli precisi. Schede di sicurezza del prodotto sono disponibili su richiesta specifica.
7. I reagenti preparati e usati e le sostanze chimiche del kit devono essere trattati come rifiuti pericolosi secondo le normative di sicurezza e la legislazione vigente nel Paese in cui il prodotto viene usato.
8. Il personale delle pulizie dev'essere informato dal personale specializzato sui possibili rischi e sulle procedure da adottare.
9. Evitare il contatto con la soluzione stop. Può causare irritazioni e ustioni della pelle.
10. Alcuni reagenti contengono azido di sodio ( $\text{NaN}_3$ ) come conservante. In caso di contatto con occhi e pelle risciacquare subito abbondantemente.  $\text{NaN}_3$  potrebbe reagire con piombo e rame piombato formando metalli azidici esplosivi. Quando si eliminano i reagenti provvedere a bagnarli con grandi quantità di acqua per evitare formazione di azidi.
11. Tutti i reagenti del kit contenenti siero umano o plasma sono risultati negativi rispetto a HIV I/II, HBsAg e HCV. Si raccomanda tuttavia di trattarli come potenzialmente pericolosi poiché non si può escludere in maniera assoluta la presenza di questi o di altri agenti infettivi.

**32 CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

Il kit è spedito e trasportato a temperatura ambiente e deve essere conservato a 2 °C - 8 °C. Non esporre a luce solare diretta e ad alte temperature. Le informazioni relative a conservazione e stabilità di tutti i reagenti e dei campioni sono riportate nel capitolo corrispondente.

I reagenti non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata. Il Kit è stabile fino a tre mesi dopo la prima apertura se la piastra per microtitolazione è confezionata in una busta accuratamente chiusa, le bottiglie sono ben chiuse con il loro tappo a vite ed il kit viene conservato ad una temperatura di 2 °C - 8 °C.

**33 PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI****Siero, Plasma (EDTA, Eparina)**

Osservare le classiche precauzioni durante il prelievo venoso. Conservare l'integrità del campione di sangue dal momento del prelievo al momento dell'esecuzione del test. Non usare campioni emolizzati, itterici o lipemici. I campioni torbidi devono essere centrifugati per rimuovere il materiale particolato al loro interno.

Conservazione:	2 °C - 8 °C	-20 °C	Non esporre alla luce solare diretta e al calore.
Stabilità:	7 giorni	> 7 giorni	Evitare la ripetizione di cicli di congelamento/scongelo.

**– MATERIALE FORNITO**

Quantità	Simbolo	Componente
1 x 12 x 8	<b>MTP</b>	<b>Micropiastra</b> Strisce separabili. Ricoperta con antigene specifico.
1 x 15 mL	<b>ENZCONJ IgA</b>	<b>Coniugato Enzimatico IgA</b> Di colore rosso. Pronto/a all'uso. Contiene: anti-umano IgA, coniugato a perossidasi (coniglio), tampone contenente proteine, 0.01 % Metilistiazolinone, 0.01 % Bromonitrodioxane e 5 mg/L ProClin.
1 x 4 x 2 mL	<b>CAL A-D</b>	<b>Standard A-D</b> 1; 10; 50; 200 U/mL. Pronto/a all'uso. Standard A = Controllo Negativo, Standard B = Controllo Cut-Off Standard C = Controllo debolmente positivo, Standard D = Controllo Positivo Contiene: Siero umano con IgA anticorpi contro Brucella, PBS, 0.01 % Metilistiazolinone e 0.01 % Bromonitrodioxane.
1 x 60 mL	<b>DILBUF</b>	<b>Tampone Diluente</b> Pronto/a all'uso. Contiene: PBS Tampone, BSA, < 0.1 % NaN <sub>3</sub> .
1 x 60 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	<b>Tampone Lavaggio, Concentrato (10x)</b> Contiene: PBS Tampone, Tween 20.
1 x 15 mL	<b>TMB SUBS</b>	<b>Soluzione Substrato TMB</b> Pronto/a all'uso. Contiene: TMB.
1 x 15 mL	<b>TMB STOP</b>	<b>Soluzione Stop TMB</b> Pronto/a all'uso. 0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
2 x	<b>FOIL</b>	<b>Pellicola Adesiva</b> Per coprire la Micropiastra durante l'incubazione.
1 x	<b>BAG</b>	<b>Sacchetto di plastica</b> Risigillabile. Per conservare a secco le strisce non usate.

**34 MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

1. Micropipette (Multipette Eppendorf o dispositivi simili, < 3 % CV). Volumi: 5; 50; 100; 500 µL
2. Cilindri calibrati
3. Tubi (1 mL) per diluizione dei campioni
4. Micropipetta 8-Canali con contenitori per reagenti
5. Bottiglia d'acqua, dispositivo di lavaggio automatico o semi-automatico per micropiastre
6. Lettore per micropiastre in grado di leggere ad assorbanza di 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 600-650 nm)
7. Acqua bidistillata o deionizzata
8. Salviette di carta, puntali e cronometro

– **NOTE PER LA PROCEDURA**

1. Qualsiasi manipolazione impropria dei campioni o modifica alla procedura può compromettere i risultati. Rispettare rigorosamente i volumi, i tempi e le temperature di incubazione e i passaggi di pretrattamento dei campioni indicati in metodica. Utilizzare pipette calibrate.
2. Una volta iniziato il test completare tutti i passaggi senza interruzioni. Assicurarsi che tutti i reagenti siano stati precedentemente preparati in tempo utile. Far raggiungere la temperatura ambiente ai campioni e ai componenti del kit (18 °C- 25 °C) e mescolare delicatamente ciascun reattivo liquido e campione prima dell'uso. Non creare schiuma durante il mescolamento.
3. Evitare la contaminazione di reagenti, pipette, pozzetti o provette. Usare puntali di plastica nuovi per ogni reagente, standard e campione. Non scambiare i tappi tra loro. Tappare sempre i flaconi non utilizzati. Non riutilizzare pozzetti/provette o reagenti.
4. Usare uno schema di pipettamento per realizzare un'appropriata distribuzione sulla piastra.
5. Il tempo di incubazione influisce sui risultati. Tutti i pozzetti dovrebbero essere dispensati nello stesso ordine e sequenza temporale. Si raccomanda una pipetta multicanale a 8 canali per pipettare le soluzioni in tutti i pozzetti.
6. Il lavaggio della micropiastra è importante. Pozzetti lavati in modo inappropriato possono portare a risultati erranei. Si raccomanda una pipetta multicanale o un lavatore automatico per piastre. Non far asciugare i pozzetti tra le varie incubazioni. Non graffiare i pozzetti rivestiti durante risciacqui e aspirazioni. Risciacquare e versare i reagenti con cura. Durante i risciacqui assicurarsi che i pozzetti siano ben riempiti con la soluzione di lavaggio e che non ci siano residui nei pozzetti.
7. L'umidità influisce sui pozzetti/tubi rivestiti. Non aprire l'involucro finché non ha raggiunto la temperatura ambiente. Riporre immediatamente i tubi/pozzetti non utilizzati nell'involucro con il dissecante.

– **ISTRUZIONI PRE-TEST**○ **Preparazione dei Componenti**

Il contenuto del kit per 96 determinazioni può essere diviso per 3 esecuzioni separate.

I volumi indicati di seguito si riferiscono a un'esecuzione con 4 strisce (32 determinazioni).

Diluire / dissolvere	Componente		Diluente	Rapporto	Note	Conservazione	Stabilità
20 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	180 mL	acqua bidist.	1:10	Riscaldare a 37 °C per sciogliere i cristalli. Mescolare energicamente.	2 °C - 8 °C	8 settimane

○ **Diluizione dei Campioni**

Campione	da diluire	con	Rapporto	Note
Siero / Plasma	sempre	DILBUF	1:101	p.e. 5 µL + 500 µL DILBUF

Campioni con concentrazioni superiori allo standard più alto devono essere ulteriormente diluiti.



### 35 PROCEDURA DEL TEST

1. Pipettare **100 µL** di **Standard e campione diluito** nei rispettivi pozzetti della Micropiastra. Nei test qualitativi è usato solamente Standard B.
22. Coprire la piastra con pellicola adesiva. **Incubare 60 min a 18 °C - 25 °C.**
23. Rimuovere la pellicola adesiva. Eliminare la soluzione d'incubazione. Lavare la piastra **3 volte** con **300 µL** di **Tampone Lavaggio diluito**. Rimuovere l'eccesso di soluzione picchiettando la piastra capovolta su una salvietta di carta.
24. Pipettare **100 µL** di **Coniugato Enzimatico** in ogni pozzetto.
25. Coprire la piastra con una nuova pellicola adesiva. **Incubare 30 min a 18 °C - 25 °C.**
26. Rimuovere la pellicola adesiva. Eliminare la soluzione d'incubazione. Lavare la piastra **3 volte** con **300 µL** di **Tampone Lavaggio diluito**. Rimuovere l'eccesso di soluzione picchiettando la piastra capovolta su una salvietta di carta.
27. Per aggiungere le Soluzioni Substrato e Stop usare, possibilmente, una micropipetta 8-canali. Pipettare con intervalli di tempo costanti per le Soluzioni Stop e Substrato. Usare uno spostamento positivo ed evitare la formazione di bolle d'aria.
28. Pipettare **100 µL** di **Soluzione Substrato TMB** in ogni pozzetto.
29. **Incubare 20 min a 18 °C - 25 °C** al buio (senza foglio adesivo).
30. Fermare la reazione substrato aggiungendo **100 µL** di **Soluzione Stop TMB** in ogni pozzetto. Mescolare delicatamente il contenuto agitando leggermente la piastra. Il colore passa da blu a giallo.
31. **Misurare** la densità ottica con un fotometro a **450 nm** (Lunghezza d'onda di riferimento: 600-650 nm) entro **60 min** dopo aver pipettato la Soluzione Stop.

### 36 CONTROLLO DI QUALITÀ

I risultati del test sono validi solo se il test è stato eseguito seguendo le istruzioni per l'uso. L'utente deve inoltre attenersi rigorosamente ai principi della BPL (Buona Pratica di Laboratorio) o a norme equivalenti. Gli utenti e il laboratorio devono avere un sistema di formulazione della diagnosi conforme alle Buone Pratiche di Laboratorio. Tutti gli standards/controlli del kit devono rientrare nei limiti di accettabilità dichiarati sul certificato di Controllo Qualità. Se i criteri non sono soddisfatti il test non è valido e dovrebbe essere ripetuto. Ogni laboratorio dovrebbe usare campioni noti come ulteriori controlli. Si consiglia la partecipazione a programmi di controllo qualità periodici.

In caso di deviazioni devono essere forniti i seguenti dati: Scadenza dei reagenti (preparati), condizioni di conservazione, pipette, strumenti, condizioni di incubazione e metodi di lavaggio.

### 37 CALCOLO DEI RISULTATI

L'evaluazione del test può essere eseguita qualitativamente o quantitativamente.

#### ○ Evaluazione Qualitativa

Il valore di Cut-off è fornito dalla densità ottica (DO) dello Standard B (Standard Cut-off). L'Indice Cut-off (COI) è calcolato sulla base della densità ottica media dei campioni e del Valore Cut-off. Campioni la cui densità ottica non differisca più del 20 % dal Cut-off (zona grigia) vanno considerati dubbi. Campioni con DO superiore sono positivi, campioni con DO inferiori sono negativi.

L'Indice Cut-off (COI) dei campioni si ottiene con la formula seguente:

$$\text{COI} = \frac{\text{DO Campioni}}{\text{DO Standard B}}$$

#### ○ Evaluazione Quantitativa

La DO ottenute per gli standard (asse y, lineare) sono messe in grafico rispetto alla loro concentrazione (asse x, logaritmico) sia su carta per grafico semilogaritmico che con metodo automatico. Usando un programma telematico si consigliano i metodi „Cubic-Spline“ o „Punto-Punto“, in quanto estremamente precisi nella valutazione dei dati di misurazione rispetto ad altri modelli di analisi.

Per il calcolo della curva standard utilizzare ogni segnale degli standard (omettere ovviamente i valori dei duplicati molto al di fuori dei risultati attesi e impiegare il valore singolo più plausibile).

La concentrazione dei campioni può essere ricavata dalla curva standard.

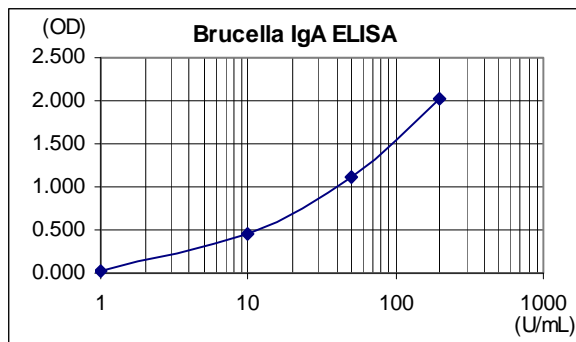
La diluizione iniziale è stata presa in considerazione quando si sono letti i risultati sul grafico. I risultati di campioni con prediluizioni superiori devono essere moltiplicati per il fattore di diluizione.

I campioni con concentrazioni superiori al più alto degli standards devono essere diluiti come descritto nel paragrafo ISTRUZIONI PRE-TEST e ritestati.

**Tipica Curva di Calibrazione**

(Esempio. Non usare per il calcolo!)

Standard	U/mL	DO <sub>Media</sub>
A	1	0,022
B	10	0,479
C	50	0,789
D	200	1,936



**- INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Metodo	Intervallo	Interpretazione
Quantitativo (Curva Standard)	< 8 U/mL	negativo
	8 – 12 U/mL	dubbio
	> 12 U/mL	positivo
Qualitativo (Indice Cut-off, COI)	< 0,8	negativo
	0,8 – 1,2	dubbio
	> 1,2	positivo

I soli risultati non dovrebbero essere l'unica motivazione alla base di una scelta terapeutica. Devono essere correlati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

**38 VALORI ATTESI**

In uno studio interno, soggetti apparentemente sani hanno mostrato i risultati seguenti.

Ig Isotipo	n	Interpretazione		
		positivo	dubbio	negativo
IgA	88	1,1 %	3,4 %	95,5 %

**39 LIMITI DELLA PROCEDURA**

La raccolta e conservazione dei campioni ha influenza significativa sui risultati del test. Vedere la sezione PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI per maggiori dettagli.

Azide e thimerosal a concentrazioni > 0.1 % interferiscono con questo test e possono portare a risultati non veritieri.

I seguenti componenti del sangue non hanno effetto significativo (+/-20 %) sui risultati del test fino ai livelli di concentrazione riportati in tabella:

Emoglobina	8,0 mg/mL
Bilirubina	0,3 mg/mL
Trigliceridi	5,0 mg/mL

**40 PERFORMANCE**

Intra-Saggio Precisione	9,3 %
Inter-Saggio Precisione	8,4 %
Inter-Lotto Precisione	4,4 – 10,5 %
Sensibilità Analitica	1,14 U/mL
Recupero	92 – 114 %
Linearità	69 – 110 %
Reattività Crociate	Non è stata riscontrata reattività-crociate con: Bordetella pertussis
Specificità clinica	100 %
Sensibilità clinica	100 %

– **PRODUCT LITERATURE REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA**

1. Dieterich RA, Morton JK, Zarnke RL. J. Wildl. Dis., 27: 470 (1991).
2. Goldstein EJ. Infect. Dis. Clin. North Am., 5: 117 (1991).
3. Greiser-Wilke I, MacMillan AP, Moennig V. Tierärztl. Prax., 19: 131 (1991).
4. Murrell IG, Matthews BJ. Med. Hypotheses, 33: 43 (1990).
5. Smith MC. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 6: 705 (1990).
6. Suter O. Schweiz. Rundsch. Med. Prax., 80: 1229 (1991).
7. Williams JD, Heck FC, Davis DS et al. Vet Immunol. Immunopathol., 29: 79 (1991).
8. Young EJ. Rev. Infect. Dis., 13: 359 (1991).

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité