



virion\serion



virion\serion

YOUR  
GLOBAL  
PARTNER  
IN  
DIAGNOSTICS

SERION ELISA classic Brucella IgA/IgG/IgM

## SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

**Manufacturer**  
**Fabricante**  
**Κατασκευαστής**  
**Fabricante**  
**Výrobce**

Institut Virion\Serion GmbH

Friedrich-Bergius-Ring 19  
D - 97076 Würzburg, Germany  
Telefon: +49 (0) 9 31 / 30 45 0  
Fax: +49 (0) 9 31 / 30 45 100

E-Mail: [dialog@virion-serion.de](mailto:dialog@virion-serion.de)  
Internet: [www.virion-serion.de](http://www.virion-serion.de)



Instructions - English  
Instrucciones de empleo - Español  
Οδηγίες χρήσης - Ελληνικά  
Instruções de emprego - Português  
Pokyny - Český

(Version/Versión/Έκδοση/Versão/Verze 12.11/12-1)

## Updates

Please pay attention to the differences in comparison to the previous version.

**Current version Nr.:** V 12.11/12-1

**Previous version:** V 11.11/05-1

**Update in section:** 5, 7.2.1

### **SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM** **CONTENTS**

- 1 INTENDED USE
- 2 DIAGNOSTIC RELEVANCE
- 3 TEST PRINCIPLE SERION ELISA *classic*
- 4 KIT COMPONENTS
- 5 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED
- 6 STORAGE AND STABILITY
- 7 TEST PROCEDURE SERION ELISA *classic*
  - 7.1 Evidence of Deterioration
  - 7.2 Sample Preparation and Storage
  - 7.3 Preparation of Kit Reagents
  - 7.4 Overview - Test Procedure
  - 7.5 Manual Test Procedure
  - 7.6 Automated Test Procedure
  - 7.7 Positive Control / Accuracy Control
- 8 TEST EVALUATION
  - 8.1 Single-Point Quantification with the 4PL Method
  - 8.2 Criteria of Validity
  - 8.3 Calculation SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Limits of Quantification
  - 8.5 Borderline Ranges
  - 8.6 Interpretation of Results
  - 8.7 Reference Range of healthy Individuals
- 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS
  - 9.1 Sensitivity and Specificity
  - 9.2 Reproducibility
- 10 SAFETY MEASURES
  - 10.1 Statements of Warning
  - 10.2 Disposal
- 11 REFERENCES



current version No.: V 12.11/12-1  
previous version: V 11.11/05-1

EN

ES

GR

PT

CZ

## SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

### Enzyme-immunoassay for determination of human antibodies for *in vitro* diagnostic use

SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgA	Order Nr.: ESR116A
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgG	Order Nr.: ESR116G
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgM	Order Nr.: ESR116M

#### 1 INTENDED USE

SERION ELISA *classic* Brucella IgA, IgG and IgM tests are quantitative and qualitative immunoassays for the detection of human antibodies in serum and plasma directed against human pathogenic *Brucella ssp.*. The evaluation of individual immunoglobulin classes can be used for the determination of pathogen contact and disease stage.

#### 2 DIAGNOSTIC RELEVANCE

*Brucella ssp.* are gram-negative non-motile bacteria which live as intracellular parasites in a wide spectrum of farm animals. Human infection is primarily caused by *Brucella melitensis* ("Malta fever"), *Brucella abortus* ("Morbus Bang") and *Brucella suis*. The pathogen is transmitted by infected animals (zoonosis), their excrement and contaminated food, particularly unpasteurized dairy products.

The disease starts with general symptoms progressing to moderate fever as the acute phase begins, characterized by rising fever in the evenings, hepatomegaly and splenomegaly or swollen lymph nodes. Undulating fever with afebrile intervals are characteristic for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* infections.

Spontaneous healing or transition into a chronic stage with a wide spectrum of symptoms is possible. Multiple organs or organ systems, bones or joints can be affected during the chronic stage. Histologically, characteristic granulomas are observed in infected tissues.

Bacterial endocarditis is fatal if it remains untreated. During the late stage of brucellosis, neurologic and even psychiatric manifestations can occur.

For differential diagnosis the following diseases should be considered: *typhus abdominalis*, lymphoma, tuberculosis, tularemia, borreliosis, viral hepatitis, influenza.

Due to the variable clinical picture of chronic brucellosis, diagnosis is possible only by direct detection of the pathogen or detection of specific antibody response in serum or CSF. Direct pathogen detection in culture systems can be performed with punctate from blood, bone marrow, synovia or urine but the special nutrient demands of *Borrelia* makes this difficult and limited to specialist laboratories. More rapid results can be obtained using serological methods such as agglutination tests or complement fixation tests. To differentiate between acute and chronic Brucellosis the method of choice is ELISA which offers sensitivity, specificity and the possibility of differentiating between IgA, IgG and IgM.

### 3 TEST PRINCIPLE SERION ELISA *classic*

The ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) is an immunoassay, which is particularly suited to the determination of antibodies in the field of infectious serology. The reaction is based on the specific interaction of antibodies with their corresponding antigen. The test strips of the SERION ELISA *classic* microtiter plate are coated with specific antigens of the pathogen of interest. If antibodies in the patient's serum sample are present, they bind to the fixed antigen. A secondary antibody, which has been conjugated with the enzyme alkaline phosphatase, detects and binds to the immune complex. The colourless substrate p-nitrophenylphosphate is then converted into the coloured product p-nitrophenol. The signal intensity of this reaction product is proportional to the concentration of the analyte in the sample and is measured photometrically.

#### 4 KIT COMPONENTS

Test Components	Pieces / Volume
<p><b>Break apart microtiter test strips each with eight antigen coated single wells,</b> (altogether 96) <b>[MTP]</b>, 1 frame. The coating material is inactivated.</p>	12 pieces
<p><b>Standard serum (ready-to-use) [STD]</b>, Human serum in protein containing phosphate buffer; negative for anti-HIV Ab, HBs-Ag (Hepatitis B-Virus surface antigen) and anti-HCV Ab; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide; colouring: Amaranth O.</p>	2 x 2 ml
<p><b>Negative control serum (ready-to-use) [NEG]</b>, Human serum in protein containing phosphate buffer; negative for anti-HIV Ab, HBs-Ag (Hepatitis B-Virus surface antigen) and anti-HCV Ab; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide; colouring: Lissamin Green V.</p>	2 ml
<p><b>Anti-human IgA, IgG or IgM conjugate (ready-to-use) [APC]</b>, Anti-human IgA, IgG or IgM polyclonal antibody, conjugated to alkaline phosphatase, stabilised with protein stabilisation solution; preservative: 0.01 % methylisothiazolone, 0.01 % bromnitrodioxane.</p>	13 ml
<p><b>Washing solution concentrate (sufficient for 1000 ml) [WASH]</b>, Sodium chloride solution with Tween 20 and 30 mM Tris/HCl, pH 7,4; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide.</p>	33,3 ml
<p><b>Dilution buffer [DILB]</b>, Protein containing phosphate buffer with Tween 20; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide; colouring: 0.01 g/l Bromphenol blue.</p>	2 x 50 ml
<p><b>Stopping solution [STOP]</b>, 1.2 N sodium hydroxide.</p>	15 ml
<p><b>Substrate (ready-to-use) [pNPP]</b>, Para-nitrophenylphosphate in solvent free buffer; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide (Substrate in unopened bottle may have a slightly yellow coloring, which does not reduce the quality of the product!)</p>	13 ml
<p><b>Quality control certificate with standard curve and evaluation table [INFO]</b>, (quantification of antibodies in IU/ml or U/ml).</p>	2 pages

## 5 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- common laboratory equipment
- for the IgM detection: SERION Rf-Absorbent, order no. Z200 (20 ml)
- photometer for microtitre plates with filter, wavelength 405 nm, recommended reference wavelength 620 nm - 690 nm (e.g. 650 nm)
- incubator 37 °C
- moist chamber
- distilled water
- Click-Clips (order no. VT120)

## 6 STORAGE AND STABILITY

Reagent	Storage	Stability
Microtiter strips (coated with antigen)	unopened  after opening at 2 – 8 °C in closed aluminum bag with desiccant  <i>Strips which are not used must be stored dry in the closed aluminum bag.</i>	see expiry date;  minimum shelf-life: four weeks;  shelf-life in case of proper use and storage until expiry date
Control sera / Standard sera	after opening at 2 – 8 °C	see expiry date; 24 months as of production
Conjugate	ready-to-use solution at 2 – 8 °C <i>Avoid contamination e.g. by using sterile tips.</i>	see expiry date; 28 months as of production
Dilution buffer	Unopened  after opening at 2 – 8 °C  <i>Discard cloudy solutions.</i>	see expiry date; 36 months as of production; 24 months
Washing solution	Concentrate after opening at 2 – 8 °C working dilution at 2 – 8 °C working dilution at room temperature <i>Bottles used for the working dilution should be cleaned regularly. Discard cloudy solutions.</i>	see expiry date; 2 weeks; 1 week
Substrate	ready-to-use solution at 2 – 8 °C, stored protected from light <i>Avoid contamination e.g. by using sterile tips.</i> <i>Discard if solution turns yellow (extinction against aqua dest. &gt; 0.25 OD).</i>	see expiry date;  36 months as of production
Stopping solution	After opening at room temperature	see expiry date

## 7 TEST PROCEDURE SERION ELISA *classic*

### 7.1 Evidence of Deterioration

Only use SERION ELISA *classic* reagents when using SERION ELISA *classic* immunoassays. The components must not be exchanged for reagents of other manufacturers. Standard and control sera of SERION ELISA *classic* immunoassays are defined exclusively for the test kit to be used and must not be used in other lots. Dilution buffer, washing solution, substrate and stop solution can be used for all SERION ELISA *classic* immunoassays irrespective of the lot and the test.

There are three different conjugate concentrations for each immunoglobulin class: LOW, MEDIUM, HIGH. The classification is written on each label as follows:

e.g. IgG +            low concentrated IgG conjugate  
      IgG ++        medium concentrated IgG conjugate  
      IgG +++       high concentrated IgG conjugate

In rare cases the use of special conjugate is necessary to guarantee consistent quality of our products. Special conjugates are produced in a separate lot and do not carry the “+” sign and are not exchangeable with other conjugates.

Please pay close attention to information on labels!

Unopened, all components of the SERION ELISA *classic* tests may, if stored accordingly, be used up to the expiry dates given on the labels. Reagents may not be used after date of expiry.

Dilution or alteration of the reagents may result in a loss of sensitivity.

Avoid exposure of reagents to strong light during storage and incubation. Reagents must be tightly closed after use to avoid evaporation and contamination.

To open the aluminum bag of the microtiter plate please cut off the top of the marked side only, in order to guarantee proper reclosing. Do not use the strips if the aluminum bag is damaged or if the bag with remaining strips and desiccant was not properly reclosed.

Use aseptic techniques when removing aliquots from the reagent tubes to avoid contamination. To avoid false positive results ensure not to contact or splash the top-walls of wells while pipetting conjugate. Take care not to mix the caps of the bottles and/or vials.

Reproducibility of test results is dependent on thorough mixing of the reagents. Agitate the flasks containing control sera before use and also all samples after dilution (e.g. by using a vortex mixer).

Be sure to pipette carefully and comply with the given incubation times and temperatures. Significant time differences between pipetting the first and last well of the microtiter plate



when dispensing samples and control sera, conjugate or substrate can result in different pre-incubation times, which may influence the precision and reproducibility of the results.

Optimum results can only be achieved if the instructions are strictly followed.

The SERION ELISA *classic* immunoassay is only valid if the lot-specific validation criteria on the quality control certificate are fulfilled.

Adequate washing avoids test unspecificities. Therefore, the washing procedure should be carried out carefully. All of the flat bottom wells should be filled with equal volumes of washing buffer. At the end of the procedure ensure that the wells are free of all washing buffer in order to avoid uncontrolled dilution effects. Avoid foaming!

Take care not to damage the inscription (pathogen / antibody class) on the microtiter test strips during washing and aspiration to avoid confusion.

## 7.2 Sample Preparation and Storage

Lipaemic, hemolytic or icteric samples (serum or plasma) should only be tested with caution. Obviously contaminated samples should not be tested. Serum or plasma (EDTA, citrate, heparin) collected according to standard laboratory methods are suitable samples. Samples must not be thermally inactivated.

### 7.2.1 Dilution of Samples

Before running the test, patient samples ( $V_1$ ) must be diluted in dilution buffer ( $V_2$ ) as follows:

#### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	add	10 $\mu$ l	patient's sample
	each to	1000 $\mu$ l	dilution buffer

After dilution and before pipetting into the microtiter plate the samples must be mixed thoroughly to prepare a homogenous solution.

## SERION ELISA *classic* Brucella IgM

### Interference with rheumatoid factors

Rheumatoid factors are autoantibodies mainly of the IgM class, which preferably bind to IgG immune complexes. The presence of non-specific IgM antibodies (rheumatoid factors) can lead to false-positive results in the IgM assay. Furthermore, the possibility exists, that weak-binding pathogen-specific IgM antibodies may be displaced by stronger-binding IgG antibodies leading to a false negative IgM result. Therefore it is necessary to pretreat samples with rheumatoid factor-absorbens prior to IgM detection (SERION RF-Absorbent, Order Nr.: Z200 (20 ml/100 tests)). Rf-absorption is performed by incubation of the patient's sample in Rf-dilution buffer for 15 minutes at room temperature or over night at 4 °C. The test procedure is described in a separate instruction manual.

Before running the test, rheumatoid factor-absorbent ( $V_1$ ) must be diluted 1+4 in dilution buffer ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	add	200 $\mu$ l	Rf-absorbent
		each to 800 $\mu$ l	dilution buffer

Patient's samples ( $V_4$ ) must be diluted in this Rf-dilution buffer ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	add	10 $\mu$ l	patient's sample
		each to 1000 $\mu$ l	Rf-dilution buffer

After dilution and before pipetting into the microtiter plate the samples must be mixed thoroughly to prepare a homogenous solution.

### 7.2.2 Sample Storage

The patient's samples should not be stored for more than 7 days at 2 – 8 °C. Extended storage is possible at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freezing and thawing of samples. Diluted samples can be stored at 2 – 8 °C for one week.

### 7.3 Preparation of Kit Reagents

Bring all reagents to room temperature before testing.

#### 7.3.1 Microtiter Test Strips

The microtiter test strips in frames are packed with a desiccant in an aluminum bag. Take unrequired cavities out of the frame and put them back into the aluminum bag. Close bag carefully to ensure airtight conditions.

#### 7.3.2 Control Sera / Standard Sera

Control and standard sera are ready-to-use and must not be diluted any further. For each test run - independent of the number of microtiter test strips to be used - control and standard sera must be included. The standard sera should be set up in duplicate.

Do not treat control sera with Rf-absorbent.

#### 7.3.3 Anti-human IgA, IgG or IgM AP-Conjugate (ready-to-use)

Conjugates with the same concentration and of the same immunoglobulin class are interchangeable. Avoid contamination of ready-to-use conjugates e. g. by using sterile tips.

#### 7.3.4 Washing Solution

Dilute washing buffer concentrate ( $V_1$ ) 1:30 with aqua dest. to a final volume of  $V_2$ .

Example:

Buffer concentrate ( $V_1$ )	Final volume ( $V_2$ )
33.3 ml	1000 ml
1.0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Dilution Buffer for Samples (ready-to-use)

#### 7.3.6 Substrate (ready-to-use)

Avoid contamination of the ready-to-use substrate solution e. g. by using sterile tips.

#### 7.3.7 Stopping Solution (ready-to-use)

## 7.4 Overview - Test Procedure

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM quantitative

In case of IgM detection absorption of rheumatoid factor, see No. 7.2.1;  
Incubation 15 minutes at room temperature or over night at 4 °C

sample dilution<sup>1</sup>  
(patient's samples)  
1+100

Pipette diluted samples and ready-to-use control /  
standard sera into the microtest wells (100 µl)



INCUBATION 60 Min./ 37 °C  
moist chamber



WASH (4 x 300 µl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Pipette conjugate solution [APC] (100 µl)



INCUBATION 30 Min./ 37 °C  
moist chamber



WASH (4 x 300 µl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Pipette substrate solution [pNPP] (100 µl)



INCUBATION 30 Min./ 37 °C  
moist chamber



Pipette stopping solution [STOP] (100 µl)



READ EXTINCTION at 405 nm

<sup>1</sup>Special dilution buffers for the following SERION ELISA *classic* tests:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Parvovirus B19 IgM and Hantavirus Puumala IgG, IgM

<sup>2</sup>For manual use:  
tap plate at the end of the wash procedure on paper towel.

## 7.5 Manual Test Procedure

1. Place the required number of **cavities in the frame** and prepare a protocol sheet.
2. Add each **100 µl of diluted sample or ready-to-use controls** into the appropriate wells of microtiter test strips. Spare one well for substrate blank, e.g.:

IgA/IgG/IgM quantitative	
well no.	
well A1	Substrate blank
well B1	Negative Control
well C1	Standard serum
well D1	Standard serum
well E1	Patient 1....

3. **Sample incubation** for 60 minutes (+/- 5 min) at 37 °C (+/- 1 °C) in moist chamber
4. After incubation **wash** all wells with washing solution (by automated washer or manually):
  - aspirate or shake out the incubation solution
  - fill each well with 300 µl washing solution
  - aspirate or shake out the washing buffer
  - repeat the washing procedure 3 times (altogether 4 times!)
  - dry by tapping the microtiter plate on a paper towel
5. **Addition of conjugate**  
Add 100 µl of the ready-to-use IgA/IgG/IgM conjugate to the appropriate wells (except substrate blank)
6. **Conjugate incubation** for 30 minutes (+/- 1 min)\* at 37 °C (+/- 1 °C) in moist chamber.
7. After incubation **wash** all wells with washing solution (see above)
8. **Addition of substrate**  
Add 100 µl of ready-to-use substrate solution to each well (including well for substrate blank!)
9. **Substrate incubation** for 30 minutes (+/- 1 min)\* at 37 °C (+/- 1 °C) in moist chamber.
10. **Stopping of the reaction**  
Add 100 µl stopping solution to each well, shake microtiter plate gently to mix.
11. **Read extinction**  
Read optical density (OD) within 60 minutes at 405 nm against substrate blank, reference wave length between 620 nm and 690 nm (e.g. 650 nm).

\* Please note, that under special working-conditions internal laboratory adaptations of the incubation times may be necessary.

## 7.6 Automated Test Procedure

SERION ELISA are suited for processing on automats and evaluated for use with Immunomat™ as well as with DYNEX DSX® and DS2®. The automated processing is performed analogous to manual use. Please note, that under special working-conditions internal laboratory adaptations of the incubation times may be necessary.

## 7.7 Positive Control / Accuracy Control

For the periodic verification of the test method, in order to fulfil the requirements of laboratory internal quality management systems, we recommend using SERION ELISA *controls* to determine precision and accuracy of SERION ELISA *classic* test runs. The use of SERION ELISA *controls* is described in specific instruction manuals.

## 8 TEST EVALUATION

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Single-Point Quantification with the 4PL Method

Optimised assignment of extinction signals to quantitative values is guaranteed by using non-linear functions, which adjust a sigmoide curve without any further transformation to OD-values. Determination of antibody concentrations with the SERION ELISA *classic* is carried out by the 4 parameter logistic-log-model (4 PL) which is ideal for exact curve-fitting. It is based on the formula:

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{Conc.})}}$$

The parameters A, B, C, and D are representative for the exact shape of the curve:

- |                       |               |
|-----------------------|---------------|
| 1. lower asymptote    | ⇒ parameter A |
| 2. slope of the curve | ⇒ parameter B |
| 3. turning point      | ⇒ parameter C |
| 4. upper asymptote    | ⇒ parameter D |

For each lot the standard curve is evaluated by Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg, Germany) in repeated test runs under optimal conditions. Time consuming and cost intensive construction of the standard curve by the user is not necessary.

For evaluation of antibody concentrations a lot specific standard curve as well as a lot specific evaluation table is included with each SERION ELISA *classic* test kit. The evaluation software SERION *evaluate* as well as the Microsoft® Excel-based software tool SERION *activity* are available on request.

To compensate for normal test variations and also for test run control a standard serum is used in each individual test run. For this control serum a reference value with a validity range is determined by the quality control of the producer. Within this range a correct quantification of antibody concentration is ensured.

## 8.2 Criteria of Validity

- The substrate blank must be < 0.25 OD.
- The negative control must produce a negative test result.
- By use of quantitative SERION ELISA *classic* tests the mean OD-value (after subtraction of the substrate blank!) of the standard serum must be within the validity range, which is given on the lot specific quality control certificate.
- The variation of OD-values of the standard serum may not be higher than 20 %.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

## 8.3 Calculation SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Non-automated Evaluation

For the SERION ELISA *classic* test evaluation a lot-specific quality control certificate with standard curve and an evaluation table is included in the test kit so that the obtained OD values may be assigned to the corresponding antibody activities. The substrate blank must be subtracted from all OD values prior to evaluation.

#### Method 1: Qualitative Evaluation

To fix the cut-off ranges multiply the mean value of the measured standard OD with the numerical data of the quality control certificate (see special case formulas), e.g.:

OD = 0.502 x MW(STD) with upper cut-off

OD = 0.352 x MW(STD) with lower cut-off

If the measured mean absorbance value of the standard serum is 0.64 OD, the range of the cut-off is in between 0.225-0.321 OD.



## Method 2:

### Continuous Determination of Antibody Activities using the Standard Curve

So called interassay variations (day to day deviations and laboratory to laboratory deviations) are compensated by multiplication of the current measured value obtained with a patient's sample with the correction factor F. This factor is calculated as follows:

$$F = \frac{\text{OD-reference value (of standard serum)}}{\text{OD-current value (of standard serum)}}$$

The procedure is necessary to adjust the current test level of the user with the lot-specific standard curve. First, daily deviations have to be corrected by calculating the correction factor F.

1. The mean of the two OD-values of the standard serum has to be calculated and checked that it is within the given validity range.
2. Calculation of the factor F: the given reference value is divided by the mean of the extinction of the standard serum:  
 $F = \text{reference value extinction STD serum} / \text{mean value extinction STD serum}.$
3. All measured values of patient's samples are multiplied by F.
4. Antibody activities in IU/ml or U/ml can be determined from the standard curve with the corrected values.

### 8.3.2 Automatic Test Evaluation with Software SERION *evaluate*

After input of the four parameters and the reference value of the standard serum, antibody activities are calculated online from processed and measured SERION ELISA *classic* test runs by the evaluation software SERION *evaluate*.

If the optical density of the standard is out of the validity range, the following message will appear.

„Standard values out of ranges in following groups: Group 1-24.” or

„Standard values differ more than 20 % in following groups: Group 1-24.”

In these cases the test run is invalid and should be repeated.

Parameters and reference value need to be changed only if there is a change of lot (evaluation table shows parameters and reference values). Correct input of the lot specific data can be checked on the basis of the standard serum activity (in IU/ml or U/ml) assigned to the standard serum. The calculated mean value of the units has to correspond to the unit value indicated on the lot specific certificate. There is an automatic correction of the measured values. In the standard version the printout displays the following:

Sample code OD-value IU/ml or U/ml Evaluation
--

### 8.4 Limits of Quantification

The limits of quantification are specified on the quality control certificate of the SERION ELISA *classic* test. The linearity of dilution within this range has been demonstrated in comprehensive evaluation studies. In case a patient sample shows a test result above the upper limit of quantification, the sample may be tested at a higher dilution. The thereby determined antibody activity must be multiplied by the additional dilution factor.

### 8.5 Borderline Ranges

The borderline ranges of the SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM tests are specified on the quality control certificates and indicate the range for borderline test results. Values obtained, when testing a patient's sample, which fall below this range indicate a negative test result; values above the borderline range are interpreted positive. In cases where the results are within the borderline range a definitive interpretation of the result is not possible. In such cases, the test should be repeated in parallel with a follow-up sample taken one to two weeks later (serum pair).

## 8.6 Interpretation of Results

Diagnosis of acute *Brucella* infection can be made by specific IgM, IgG and IgA antibody detection or a positive IgM result alone. Within two to four months after successful therapy a significant reduction in IgG titers may be evident, however, in the majority of patients this will not be such that they appear to be seronegative. IgM antibody titers usually decrease after two to three months but may in some cases persist for several months after infection.

The most important parameters for diagnosis of chronic brucellosis are IgG and IgA titers. Elevated IgG and IgA antibody titers are diagnostically relevant and indicate an early or persisting chronic infection. However, it has been recorded that only in 60 % of cases is an increase in IgG titer accompanied by a concomitant increase in IgA. In contrast only 33 % of patients display a rise in IgM titers during the chronic phase.

Crossreactions between *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* 09, *Francisella tularensis*, *Virbrio cholerae* have to be considered. Positive reactions after cholera vaccination are also possible.

## 8.7 Reference Range of healthy Individuals

Testing of random blood donor sera, collected in the region of southern Germany, with the SERION ELISA *classic* *Brucella* IgA IgG and IgM tests resulted in the following distribution. Of 180 sera, 179 (99.4 %) were negative when tested with the SERION ELISA *classic* *Brucella* IgG test and one sample (0.6 %) yielded a positive result. From 180 sera tested with the SERION ELISA *classic* *Brucella* IgA test, 180 (100 %) were negative. In addition, results from testing 180 sera in the SERION ELISA *classic* *Brucella* IgM test were as follows; 178 sera (98.9 %) tested negative, one serum (0.6 %) positive and one (0.6 %) sample was borderline. This distribution indicates a background seroprevalence rate of 1 % in the general population.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Sensitivity and Specificity

To determine the performance characteristics of SERION ELISA *classic* IgG, IgM and IgA, a study utilizing 108 healthy blood donor sera, 132 sera from children (in-patients of a children's hospital), 44 sera of in-patients with other diseases as well as 27 patients with suspected Brucellosis were tested and compared with a commercially available ELISA test. Borderline results were not included in the calculations of sensitivity and specificity.

Performance Characteristics	Sensitivity	Specificity
SERION ELISA <i>classic</i> <i>Brucella</i> IgA	> 99 %	> 99 %
SERION ELISA <i>classic</i> <i>Brucella</i> IgG	> 99 %	99.3 %
SERION ELISA <i>classic</i> <i>Brucella</i> IgM	91.3 %	> 99 %

## 9.2 Reproducibility

Intraassay reproducibility was determined by testing sera of different reactivities 20 times in one test run. Interassay reproducibility was determined by testing sera of different reactivities in 10 independent test runs.

$$\text{Coefficient of Variation (CV \%)} = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean value}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Brucella IgA:

Sample	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
weak positive	0.598	12.1	0.758	9.3
positive	1.794	7.5	2.266	7.5
strong positive	-	-	3.415	1.2

### SERION ELISA classic Brucella IgG:

Sample	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
weak positive	0.595	5.5	0.564	11.3
positive	1.239	7.2	1.352	13.3
strong positive	-	-	1.941	6.4

### SERION ELISA classic Brucella IgM:


Sample	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
weak positive	0.431	14.5	0.526	8.9
positive	1.551	6.6	1.064	7.4
strong positive	-	-	1.983	7.0

## 10 SAFETY MEASURES

### 10.1 Statements of Warning

The SERION ELISA *classic* is designed for use by qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

All kit reagents and human specimens should be handled carefully, using established good laboratory practice.

- This kit contains human blood components. Although all control- and cut-off sera have been tested and found negative for anti-HIV-ab, HBs-Ag (*Hepatitis B-Virus-surface Antigen*) and anti-HCV-ab, they should be considered potentially infectious.
- Do not pipette by mouth.
- Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable gloves, laboratory coat and safety glasses while handling kit reagents or specimens. Wash hands thoroughly afterwards.
- Patient's material and other potentially infectious material should be decontaminated after the test run.
- Reagents should be stored safely and be unaccessible to unauthorized access e.g. children.
- Stopping solution:  corrosive (C); causes acid burn (R34)  
Use safety glasses, gloves and laboratory coat while handling!

### 10.2 Disposal

Please observe the relevant statutory requirements!

## 11 REFERENCES

- [1] Araj, G.F., Lulu, A.R., Khateeb, M.I., Saadah, M.A., Shakir, R.A. (1988) ELISA versus routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. *APMIS* 96, 171-6.
- [2] Ariza, J., Pellicer, T., Pallares, R., Foz, A., Gudiol, F. (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 14, 131-40.
- [3] BgVV, RKI (1996) Brucellosen-Erkennung und Behandlung, Merkblatt für Ärzte.
- [4] Brouqui, P., Raoult, D. (2000) Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 177-207.
- [5] Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213-21.
- [6] Gad El-Rab, M. O., Kambal, A. M. (1998) Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. *J. Infect.* 36, 197-201.
- [7] Gazapo, E., Gonzalez Lahoz, J., Subiza, J.L., Baquero, M., Gil, J., de la Concha, E.G. (1989) Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. *J. Infect. Dis.* 159, 219-25.
- [8] Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., Pallares, R., Gudiol, F. (1988) Specific antibodies during relapse of human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 157, 918-24.
- [9] Yagupsky, P. (1999) Detection of Brucellae in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3437-42.



# **Actualizaciones**

**Preste atención a las diferencias en comparación con la versión anterior.**

**Nº de la versión actual: V 12.11/12-1**

**Versión anterior: V 11.11/05-1**

**Actualización en la sección: 5, 7.2.1**

ES

## **SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM CONTENIDO**

- 1 USO PREVISTO**
- 2 PERTINENCIA DIAGNÓSTICA**
- 3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic***
- 4 COMPONENTES DEL KIT**
- 5 MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO**
- 6 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**
- 7 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic***
  - 7.1 Evidencia de deterioro
  - 7.2 Preparación y conservación de la muestra
  - 7.3 Preparación de reactivos del kit
  - 7.4 Visión general - procedimiento de la prueba
  - 7.5 Procedimiento manual
  - 7.6 Procedimiento automatizado
  - 7.7 Control positivo / control de exactitud
- 8 EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS**
  - 8.1 Cuantificación de punto simple con el método 4PL
  - 8.2 Criterios de validez
  - 8.3 Cálculos del SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Límites de cuantificación
  - 8.5 Intervalos dudosos
  - 8.6 Interpretación de resultados
  - 8.7 Intervalos de referencia de individuos sanos
- 9 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO**
  - 9.1 Sensibilidad y especificidad
  - 9.2 Reproducibilidad
- 10 MEDIDAS DE SEGURIDAD**
  - 10.1 Declaraciones de advertencia
  - 10.2 Eliminación
- 11 BIBLIOGRAFÍA**



Nº de la versión actual: V 12.11/12-1  
Versión previa: V 11.11/05-1



# SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

## Enzimoimmunoensayo para la determinación de anticuerpos humanos Para uso diagnóstico *in vitro*

SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgA	Nº de pedido:	ESR116A
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgG	Nº de pedido:	ESR116G
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgM	Nº de pedido:	ESR116M

### 1 USO PREVISTO

Las pruebas de SERION ELISA *classic* Brucella IgA, IgG e IgM son inmunoensayos cuantitativos y cualitativos para la detección de anticuerpos humanos en suero y plasma dirigidos frente al patógeno *Brucella ssp.* La evaluación de clases de inmunoglobulinas individuales se puede utilizar para la determinación del contacto con el patógeno y el estadio de la enfermedad.

### 2 PERTINENCIA DIAGNÓSTICA

*Brucella ssp.* son bacterias gram negativas no móviles que viven como parásitos intracelulares en un amplio espectro de animales de granja. La infección en seres humanos es producida principalmente por *Brucella melitensis* ("Fiebre de Malta"), *Brucella abortus* ("enfermedad de Bang") y *Brucella suis*. El patógeno se transmite mediante animales infectados (zoonosis), sus excrementos y alimentos contaminados, en particular productos lácteos no pasteurizados.

La enfermedad comienza con síntomas generales que avanzan hasta fiebre moderada cuando comienza la fase aguda, caracterizada por un aumento vespertino de la fiebre, hepatomegalia y esplenomegalia o ganglios linfáticos inflamados. La fiebre fluctuante con intervalos afebriles son características de las infecciones por *Brucella melitensis* y *Brucella suis*.

Es posible la curación espontánea o una transición a una fase crónica con un amplio espectro de síntomas. Pueden estar afectados múltiples órganos o sistemas de órganos, huesos o articulaciones durante la fase crónica. Histológicamente, se observan granulomas característicos en los tejidos infectados.

La endocarditis bacteriana es fatal si se deja sin tratamiento. Durante el estadio tardío de la brucelosis, pueden ocurrir manifestaciones neurológicas e incluso psiquiátricas.

Para el diagnóstico diferencial se deberán tener en cuenta las siguientes enfermedades: *tifus abdominal*, linfoma, tuberculosis, tularemia, borreliosis, hepatitis vírica, influenza.

Debido a la situación clínica variable de la brucelosis crónica, el diagnóstico es posible únicamente mediante la detección directa del patógeno o detección de una respuesta específica de anticuerpos en el suero o LCR. La detección directa del patógeno en sistemas de cultivo se puede llevar a cabo con siembras de sangre, médula ósea, sinovia u orina pero las demandas especiales de nutrientes de *Borrelia* dificultan esto y lo limitan

a laboratorios especializados. Se pueden obtener resultados más rápidos utilizando métodos serológicos tales como la aglutinación o pruebas de fijación del complemento. Para diferenciar entre la brucelosis aguda y la crónica, el método de elección que ofrece sensibilidad, especificidad y la posibilidad de diferenciación entre IgA, IgG e IgM es ELISA.

### **3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic***

La prueba ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas) es un inmunoensayo, que es particularmente apropiado para la determinación de anticuerpos en el campo de la serología infecciosa. La reacción se basa en la interacción específica de anticuerpos con su antígeno correspondiente. Las tiras reactivas de la placa de microtitulación de SERION ELISA *classic* se recubren con antígenos específicos del agente patógeno de interés. Si los anticuerpos en la muestra de suero del paciente están presentes, se unen al antígeno fijado. Un anticuerpo secundario, que se ha conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, detecta y se une al complejo inmune. El sustrato incoloro p-nitrofenolfosfato se convierte entonces en el producto coloreado p-nitrofenol. La intensidad de la señal de este producto de reacción es proporcional a la concentración del analito en la muestra y se mide fotométricamente.

#### 4 COMPONENTES DEL KIT

Componentes de la prueba	partes / Volumen
<p><b>Pocillos de microtitulación en tiras separables, cada una de ellas con ocho pocillos individuales recubiertos de antígeno</b>            (En total son 96) <b>[MTP]</b>,            1 bastidor.            El material de recubrimiento está inactivado.</p>	12 partes
<p><b>Suero patrón (listo para usar) [STD]</b>,            Suero humano en tampón fosfato que contiene proteína;            negativo para Ac anti-VIH, Acs HB (HBs-Ag, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y Ac anti-VHC;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %;            colorante: Amaranto O.</p>	2 x 2 ml
<p><b>Suero control negativo (listo para usar) [NEG]</b>,            Suero humano en tampón fosfato que contiene proteína;            negativo para Ac anti-VIH, Acs HB (HBs-Ag, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y Ac anti-VHC;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %;            colorante: Verde Lissamin Green V.</p>	2 ml
<p><b>Conjugado FA de IgA, IgG o IgM anti-humana (listo para usar) [APC]</b>,            Anticuerpo policlonal IgA, IgG o IgM anti-humano,            conjugado con fosfatasa alcalina, estabilizado con solución que contiene proteínas;            conservante: metilisotiazolona al 0,01 %, bromonitrodioxano al 0,01 %.</p>	13 ml
<p><b>Concentrado de dilución de lavado (suficiente para 1000 ml) [WASH]</b>,            Solución de cloruro de sodio con Tween 20 y 30 mM Tris/HCl, pH 7,4;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %.</p>	33,3 ml
<p><b>Solución amortiguadora de dilución [DILB]</b>            Tampón fosfato con Tween 20 que contiene proteína;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %;            colorante: 0,01 g/l de azul de bromofenol.</p>	2 x 50 ml
<p><b>Solución de parada [STOP]</b>,            hidróxido de sodio 1,2 N.</p>	15 ml
<p><b>Sustrato (listo para usar) [pNPP]</b>,            Para-nitrofenilfosfato en solución amortiguadora sin disolvente;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %            (¡El sustrato en un frasco sin abrir puede tener una coloración ligeramente amarilla, lo que no reduce la calidad del producto!)</p>	13 ml
<p><b>Certificado de control de calidad con curva patrón y tabla de evaluación [INFO]</b>,            (cuantificación de anticuerpos en UI/ml o U/ml).</p>	2 páginas

## 5 MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- equipo habitual de laboratorio
- Para la detección de IgM: Absorbente Rf SERION, nº de pedido Z200 (20 ml)
- fotómetro para placas de microtitulación con filtro, longitud de onda 405 nm, longitud de onda de referencia recomendada 620 nm - 690 nm (p.ej., 650 nm)
- incubador a 37 °C
- cámara de humectación
- agua destilada
- Clips de cierre por presión (Click-Clips, nº de pedido VT120)

## 6 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Reactivo	Conservación	Estabilidad
Tiras de microtitulación (recubiertas con antígeno)	<p>sin abrir</p> <p>tras la apertura entre 2 – 8 °C en una bolsa de aluminio cerrada con desecante</p> <p><i>Las tiras que no se utilizan se deben conservar secas en la bolsa de aluminio cerrada.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>período de conservación mínimo: cuatro semanas;</p> <p>período de conservación en caso de utilización y conservación adecuadas hasta la fecha de caducidad</p>
Sueros control / Sueros patrón	tras la apertura entre 2 – 8 °C	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>24 meses desde su producción</p>
Conjugado	<p>solución lista para usar entre 2 – 8 °C</p> <p><i>Evite la contaminación p.ej., utilizando puntas estériles.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>28 meses desde su producción</p>
Solución amortiguadora de dilución	<p>Sin abrir</p> <p>tras la apertura entre 2 – 8 °C</p> <p><i>Deseche las soluciones turbias.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>36 meses desde su producción;</p> <p>24 meses</p>
Solución de lavado	<p>Concentrado tras la apertura entre 2 – 8 °C</p> <p>dilución de trabajo entre 2 – 8 °C</p> <p>dilución de trabajo a temperatura ambiente</p> <p><i>Los frascos utilizados para la dilución de trabajo se deben limpiar regularmente. Deseche las soluciones turbias.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>2 semanas;</p> <p>1 semana</p>
Sustrato	<p>solución lista para usar entre 2 – 8 °C, conservar protegida de la luz</p> <p><i>Evite la contaminación p.ej., utilizando puntas estériles.</i></p> <p><i>Desechar si la solución se vuelve amarilla (extinción frente al agua destilada &gt; 0,25 DO).</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>36 meses desde su producción</p>
Solución de parada	Tras la apertura a temperatura ambiente	ver fecha de caducidad

## 7 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic*

### 7.1 Evidencia de deterioro

Utilice únicamente reactivos SERION ELISA *classic* al utilizar inmunoensayos SERION ELISA *classic*. Los componentes no deben intercambiarse con reactivos de otros fabricantes. Los sueros patrón y control de los inmunoensayos SERION ELISA *classic* immunoassays están definidos exclusivamente para el kit de pruebas que se va a utilizar y no deben utilizarse en otros lotes. La solución amortiguadora de dilución, la solución de lavado, el sustrato y la solución de parada se pueden utilizar para todos los inmunoensayos SERION ELISA *classic* Independientemente del lote y de la prueba.

Existen tres concentraciones de conjugado diferentes para cada clase de inmunoglobulina: BAJO, MEDIO, ALTO. La clasificación aparece escrita en cada etiqueta como sigue:

p.ej.	IgG +	Conjugado de IgG de baja concentración
	IgG ++	Conjugado de IgG de media concentración
	IgG +++	Conjugado de IgG de alta concentración

En raros casos es necesaria la utilización de un conjugado especial para garantizar una calidad constante de nuestros productos. Los conjugados especiales se producen en un lote por separado y no llevan el signo “+” y no son intercambiables con otros conjugados.

¡Preste mucha atención a la información de las etiquetas!

Si no han sido abiertos, todos los componentes de las pruebas SERION ELISA *classic* pueden, si se conservan como corresponde, ser utilizados hasta las fechas de caducidad proporcionadas en las etiquetas. Los reactivos no se pueden utilizar después de la fecha de caducidad.

La dilución o alteración de los reactivos puede dar como resultado una pérdida de sensibilidad.

Evite la exposición de los reactivos a la luz intensa durante la conservación e incubación. Los reactivos deben estar firmemente cerrados tras su uso para evitar evaporación y contaminación.

Para abrir la bolsa de aluminio de la placa de microtitulación, corte la parte superior del lado marcado únicamente, para garantizar poder cerrarla de nuevo adecuadamente. No utilice las tiras si la bolsa de aluminio está dañada o si la bolsa con las tiras restantes y el desecante no ha sido cerrada de nuevo adecuadamente.

Utilice técnicas asépticas al retirar alícuotas de los tubos de reactivos para evitar la contaminación. Para evitar resultados falsos positivos, asegúrese de no entrar en contacto o salpicar las paredes superiores de los pocillos mientras se pipetea el conjugado. Tenga cuidado para no mezclar los tapones de los frascos y/o viales.

La reproducibilidad de los resultados de las pruebas es dependiente de una mezcla a fondo de los reactivos. Agite los matraces que contienen sueros control antes de usar también todas las muestras tras la dilución (por ejemplo, utilizando un mezclador de vórtice).

Asegúrese de pipetear con cuidado y respetar los tiempos y temperaturas de incubación proporcionados. Diferencias significativas de tiempos entre el pipeteo del primer y el último pocillo de la placa de microtitulación al dispensar muestras de sueros control, conjugado o sustrato pueden dar como resultado diferentes tiempos de preincubación, lo que puede influir en la precisión y reproducibilidad de los resultados.

Solamente se pueden lograr resultados óptimos si se siguen estrictamente las instrucciones.

El inmunoensayo SERION ELISA *classic* es válido únicamente si se cumplen los criterios de validación específicos del lote en el certificado de control de calidad.

Un lavado adecuado evita la falta de especificidad de la prueba. Por lo tanto, el procedimiento de lavado se debe llevar a cabo cuidadosamente. Todos los pocillos de fondo plano se deben rellenar con volúmenes iguales de solución amortiguadora de lavado. Al final del procedimiento asegúrese de que los pocillos no tienen nada de solución amortiguadora de lavado para evitar efectos de dilución no controlados. ¡Evite la formación de espuma!

Tenga cuidado para no dañar la inscripción (patógeno / clase de anticuerpo) en las tiras de prueba de microtitulación durante el lavado y aspiración para evitar confusiones.

## 7.2 Preparación y conservación de la muestra

Las muestras lipémicas, hemolíticas o ictericas (Suero o plasma) únicamente deben analizarse con precaución. No se deben realizar pruebas de muestras evidentemente contaminadas. El suero o plasma (EDTA, citrato, heparina) recogido de acuerdo con métodos normalizados de laboratorio son muestras apropiadas. Las muestras no deben estar inactivadas por temperatura.

### 7.2.1 Dilución de muestras

Antes de efectuar el análisis, las muestras del paciente ( $V_1$ ) se deben diluir en solución amortiguadora ( $V_2$ ) como sigue:

#### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	añadir	10 $\mu$ l	de la muestra del paciente
	a	1000 $\mu$ l	solución amortiguadora de dilución

Tras la dilución y antes de pipetear a la placa de microtitulación, se deben mezclar a fondo las muestras para preparar una solución homogénea.

## SERION ELISA *classic* Brucella IgM

### Interferencia con factores reumatoides

Los factores reumatoides son autoanticuerpos, principalmente de la clase de las IgM, que se unen preferiblemente a complejos inmunes de IgG. La presencia de anticuerpos IgM no específicos (factores reumatoides) puede conducir a resultados falsos positivos en el inmunoensayo de IgM. Además, existe la posibilidad de que anticuerpos específicos de patógenos de baja afinidad de unión a IgM, puedan quedar desplazados por anticuerpos de mayor afinidad de unión a IgG conduciendo a un resultado falso negativo para IgM. Por lo tanto es necesario tratar previamente las muestras con un absorbente de factor reumatoide antes de la detección de IgM. (absorbente de factor reumatoide SERION, N° de pedido: Z200 (20 ml/100 pruebas)). La absorción Rf se realizará mediante incubación de la muestra del paciente en solución amortiguadora de dilución Rf durante 15 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. El procedimiento de la prueba se describe en un manual de instrucciones por separado.

Antes de efectuar el análisis, el material absorbente del factor reumatoide ( $V_1$ ) se debe diluir 1+4 en solución amortiguadora ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	añadir	200 $\mu$ l	Material absorbente de Rf
	a	800 $\mu$ l	solución amortiguadora de dilución

Las muestras del paciente ( $V_4$ ) se deben diluir en esta solución amortiguadora de dilución Rf ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	añadir	10 $\mu$ l	de la muestra del paciente
	a	1000 $\mu$ l	solución amortiguadora de dilución Rf

Tras la dilución y antes de pipetear a la placa de microtitulación, se deben mezclar a fondo las muestras para preparar una solución homogénea.

### 7.2.2 Conservación de las muestras

Las muestras del paciente no se deben conservar durante más de 7 días a 2 – 8 °C. Es posible ampliar la conservación a  $\leq -20$  °C. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras. Las muestras diluidas se pueden almacenar a 2 – 8 °C durante una semana.



### 7.3 Preparación de reactivos del kit

Lleve todos los reactivos hasta la temperatura ambiente antes de realizar las pruebas.

#### 7.3.1 Tiras de prueba de microtitulación

Las tiras de pruebas de microtitulación han sido envasadas junto con un desecante en una bolsa de aluminio. Extraiga del bastidor los huecos no necesarios y póngalos dentro de la bolsa de aluminio. Cierre cuidadosamente la bolsa para garantizar condiciones herméticas.

#### 7.3.2 Sueros control / sueros patrón

Los sueros control y patrón están listos para usar y no se deben diluir más. Para cada ejecución de las pruebas – independientemente del número de tiras de pruebas de microtitulación que se vayan a utilizar- se deben incluir los sueros control y patrón. Los sueros control deberán configurarse por duplicado.

No trate los sueros control con material absorbente de Rf.

#### 7.3.3 Conjugado FA de IgA, IgG o IgM anti-humana (listo para usar)

Los conjugados con la misma concentración y de la misma clase de inmunoglobulinas son intercambiables. Evite la contaminación de los conjugados listos para usar p.ej., utilizando puntas estériles.

#### 7.3.4 Solución de lavado

Diluya concentrado de solución amortiguadora de lavado ( $V_1$ ) 1:30 con agua destilada hasta un volumen final de  $V_2$ .

Ejemplo:

Concentrado de solución amortiguadora ( $V_1$ )	Volumen final ( $V_2$ )
33,3 ml	1.000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Solución amortiguadora de dilución para muestras (lista para usar)

#### 7.3.6 Sustrato (listo para usar)

Evite la contaminación de la solución de sustrato lista para usar p.ej., utilizando puntas estériles.

#### 7.3.7 Solución de parada (lista para usar)

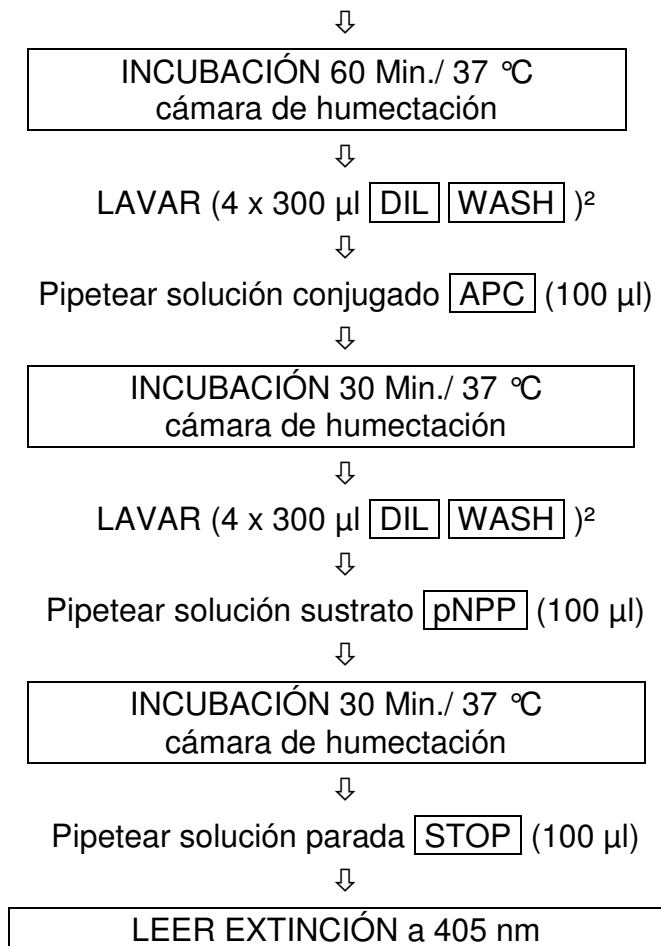
## 7.4 Visión general - procedimiento de la prueba

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM cuantitativo

En caso de IgM detección absorción de factor reumatoide, ver N° 7.2.1;  
Incubación 15 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C

dilución de la muestra<sup>1</sup>  
(muestras del paciente)  
1+100

Pipetear muestras diluidas y control listo para usar/  
sueros patrón en los pocillos de micro análisis (100 µl)



<sup>1</sup>Soluciones amortiguadoras de dilución especiales para las siguientes pruebas SERION ELISA *classic*:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Parvovirus B19 IgM y Hantavirus puumala IgG, IgM

<sup>2</sup>Para uso manual:  
Ligeros golpecitos al final del procedimiento de lavado sobre toallita de papel.

## 7.5 Procedimiento manual

1. Coloque el número necesario de **pocillos en el bastidor** y prepare una hoja de protocolo.
2. Añada **100 µl de muestra diluida o controles listos para usar** en los pocillos apropiados de las tiras de prueba de microtitulación. Reserve un pocillo para el blanco del sustrato, p.ej.:

IgA/IgG/IgM cuantitativo	
Nº pocillo	
pocillo A1	Sustrato en blanco
pocillo B1	Control negativo
pocillo C1	Suero patrón
pocillo D1	Suero patrón
pocillo E1	1...del paciente

3. **Incubación de la muestra** durante 60 minutos (+/- 5 min) a 37 °C (+/- 1 °C) en la cámara de humectación
4. Tras la incubación **lave** todos los pocillos con solución de lavado (mediante dispositivo automatizado o manualmente):
  - aspire o agite la solución de incubación
  - Llene cada pocillo con 300 µl de solución de lavado
  - aspire o agite la solución amortiguadora de lavado
  - repita el procedimiento de lavado 3 veces (¡en total son 4 veces!)
  - séquelo dando ligeros golpecitos a la placa de microtitulación sobre una toallita de papel
5. **Adición de conjugado**  
Añada 100 µl of del conjugado listo para usar IgA/IgG/IgM a los pocillos apropiados (excepto el sustrato en blanco)
6. **Incubación del conjugado** durante 30 minutos (+/- 1 min)\* a 37 °C (+/- 1 °C) en la cámara de humectación.
7. Tras la incubación **lave** todos los pocillos con solución de lavado (ver más arriba)
8. **Adición de sustrato**  
Añada 100 µl de solución de sustrato listo para usar a cada pocillo (¡incluyendo el pocillo para el sustrato en blanco!)
9. **Incubación del sustrato** durante 30 minutos (+/- 1 min)\* a 37 °C (+/- 1 °C) en la cámara de humectación.
10. **Parada de la reacción**  
Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo, agite suavemente la placa de microtitulación para mezclar.
11. **Lectura de la extinción**  
Lea la densidad óptica (DO) en los siguientes 60 minutos a 405 nm frente al sustrato blanco, la longitud de onda de referencia entre 620 nm y 690 nm (p.ej., 650 nm).

\*Se advierte que bajo condiciones de trabajo especiales internas del laboratorio pueden ser necesarias adaptaciones de los tiempos de incubación.

## 7.6 Procedimiento automatizado

SERION ELISA es apto para el procesado en equipos automáticos y ha sido evaluado para su uso con Immunomat™ así como con DYNEX DSX® y DS2®. El proceso automatizado se realiza de manera análoga al uso manual. Se advierte que bajo condiciones de trabajo especiales internas del laboratorio pueden ser necesarias adaptaciones de los tiempos de incubación.

## 7.7 Control positivo / control de exactitud

Para la verificación periódica del método de prueba, y para satisfacer los requisitos de los sistemas de gestión de calidad internos de laboratorio, recomendamos la utilización de SERION ELISA *controls* para determinar la precisión y fiabilidad de las cargas de pruebas SERION ELISA *classic*. La utilización de SERION ELISA *controls* se describe en manuales de instrucciones específicos.

## 8 EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Cuantificación de punto simple con el método 4PL

La asignación optimizada de las señales de extinción para valores cuantitativos se garantiza mediante la utilización de funciones no lineales, que se ajustan a una curva sigmoide sin ninguna transformación adicional a valores de DO. La determinación de las concentraciones de anticuerpo con SERION ELISA *classic* se lleva a cabo mediante el modelo logarítmico logístico de cuatro parámetros (4 PL) que es ideal para un ajuste exacto de las curvas. Está basado en la fórmula:

$$DO = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \text{En Conc.})}}$$

Los parámetros A, B, C, y D son representativos para la forma exacta de la curva:

- |                          |               |
|--------------------------|---------------|
| 1. asíntota inferior     | ⇒ parámetro A |
| 2. pendiente de la curva | ⇒ parámetro B |
| 3. punto de inflexión    | ⇒ parámetro C |
| 4. asíntota superior     | ⇒ parámetro D |

Para cada lote, la curva patrón es evaluada por el Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg, Alemania) en pruebas repetidas bajo condiciones óptimas.

No es necesaria una costosa y dilatada construcción de la curva estándar por el usuario.

Para la evaluación de concentraciones de anticuerpo se incluye una curva estándar específica del lote y también una tabla de evaluación específica del lote con cada kit de pruebas SERION ELISA *classic*. El software de evaluación SERION *evaluate*, así como el instrumento de software basado en Microsoft® Excel SERION *activity* están disponibles bajo petición.

Para compensar las variaciones normales de las pruebas y también para el control de la ejecución de las pruebas se utiliza un suero patrón en cada carga de pruebas individual. Para este suero control, se determina un valor de referencia con un intervalo de validez mediante el control de calidad del fabricante. Dentro de este intervalo está garantizada una correcta cuantificación de la concentración de anticuerpos.

## 8.2 Criterios de validez

- El blanco de sustrato debe ser  $< 0,25$  DO.
- El control negativo debe producir un resultado negativo de la prueba.
- Mediante el uso de pruebas cuantitativas SERION ELISA *classic* el valor de DO medio (¡después de restar el blanco de sustrato!) del suero patrón debe estar dentro del intervalo de validez, que se proporciona en el certificado de control de calidad específico del lote.
- La variación de valores DO del suero patrón no puede ser superior al 20 %.

Si no se cumplen estos criterios, la prueba no es válida y se debe repetir.

## 8.3 Cálculos del SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Evaluación no automatizada

Para la evaluación de la prueba SERION ELISA *classic* se incluye un certificado de control de calidad específico del lote con una curva patrón y una tabla de evaluación en el kit de pruebas de modo que los valores de DO obtenidos se pueden asignar a las correspondientes actividades de anticuerpo. El blanco de sustrato se debe restar de todos los valores de DO antes de la evaluación.

#### Método 1: Evaluación cualitativa

Para fijar los intervalos de corte multiplique el valor medio de la DO estándar medida con los datos numéricos del certificado de control de calidad (ver fórmulas de casos especiales), p.ej.:

$DO = 0,502 \times PM(STD)$  con corte superior

$DO = 0,352 \times PM(STD)$  con corte inferior

Si el valor de absorbancia medio medido del suero patrón es 0,64 DO, el intervalo de corte está entre 0,225-0,321 DO.

## Método 2:

Determinación continua de actividades de anticuerpo utilizando la curva estándar

Las así llamadas variaciones interensayo (desviaciones de un día a otro y de un laboratorio a otro) se compensan mediante la multiplicación del valor medido actual obtenido con una muestra del paciente con el factor de corrección F. este factor se calcula como sigue:

$$F = \frac{\text{Valor de referencia DO (de suero patrón)}}{\text{Valor actual DO (de suero patrón)}}$$

El procedimiento es necesario para ajustar el nivel actual de la prueba del usuario con la curva estándar específica del lote. En primer lugar, las desviaciones diarias tienen que ser corregidas calculando el factor de corrección F.

1. Se debe calcular la media de los dos valores DO del suero patrón y comprobar que se encuentra dentro del intervalo de validez dado.
2. Cálculo del factor F: el valor de referencia dado se divide por la media de la extinción del suero patrón:  
 $F = \text{valor referencia extinción suero STD} / \text{valor medio extinción suero STD}.$
3. Todos los valores medidos de las muestras de pacientes se multiplican por F.
4. Las actividades de anticuerpo en UI/ml o U/ml se pueden determinar a partir de la curva estándar con los valores corregidos.

### 8.3.2 Evaluación automática de la prueba con el software SERION *evaluate*

Después de la entrada de los cuatro parámetros y el valor de referencia del patrón de suero, las actividades de anticuerpos se calculan en línea a partir de cargas de pruebas SERION ELISA *classic test* procesadas y medidas mediante el software de evaluación SERION *evaluate*.

Si la densidad óptica del patrón está fuera del intervalo de validez, aparecerá el siguiente mensaje.

“Valores estándar fuera de intervalos en los siguientes grupos: grupo 1-24.” o

“El valor estándar difiere más del 20% en los siguientes grupos: grupo 1-24.”

En estos casos la ejecución de la prueba es inválida y debe repetirse.

Los parámetros y el valor de referencia deben ser modificados únicamente si existe un cambio de lote (la tabla de evaluación muestra parámetros y valores de referencia). La entrada correcta de los datos específicos del lote se puede comprobar basándose en la actividad del suero patrón (en UI/ml o U/ml) asignada al suero patrón. El valor medio calculado de las unidades debe corresponderse con el valor unitario indicado en el certificado específico del lote. Hay una corrección automática de los valores medidos. En la versión estándar el resultado muestra lo siguiente:

Código de la muestra Valor DO UI/ml o U/ml Evaluación
--

### 8.4 Límites de cuantificación

Los límites de cuantificación se especifican en el certificado de control de calidad de la prueba SERION ELISA *classic*. La linealidad de la dilución dentro de este intervalo ha sido demostrada en estudios de evaluación exhaustivos. En caso de que una muestra del paciente muestre un resultado de la prueba por encima del límite superior de cuantificación, se puede ensayar la prueba a una dilución mayor. La actividad de anticuerpo determinada así se debe multiplicar por el factor de dilución adicional.

### 8.5 Intervalos dudosos

Los intervalos dudosos de la prueba del SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM se especifican en el certificado de control de calidad e indican el intervalo para resultados dudosos de las pruebas. Los valores obtenidos, al analizar una muestra de un paciente, que caen por debajo de este intervalo indican un resultado negativo de la prueba; los valores por encima del intervalo dudoso se interpretan como positivos. En los casos en los que los resultados están dentro del intervalo dudoso no es posible una interpretación definitiva del resultado. En tales casos, se debe repetir la prueba en paralelo con una muestra de seguimiento tomada de 1 a 2 semanas más tarde (par de suero).



## 8.6 Interpretación de resultados

El diagnóstico de una infección aguda por *Brucella* se puede realizar mediante detección de anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA o bien un resultado positivo para IgM solo. En el plazo de dos a cuatro meses tras un tratamiento con éxito, puede ser evidente una reducción significativa de los títulos de IgG, sin embargo, en la mayoría de los pacientes está no será tan pronunciada como para que aparezcan como seronegativos. Los títulos de anticuerpos IgM normalmente decrecen tras dos a tres meses pero en algunos casos pueden persistir durante varios meses después de la infección.

Los parámetros más importantes para el diagnóstico de la brucelosis crónica son los títulos de IgG e IgA. Unos títulos elevados de anticuerpos IgG e IgA son relevantes en el diagnóstico e indican una infección crónica temprana o persistente. Sin embargo, se ha registrado que solamente en el 60 % de los casos un aumento del título de IgG viene acompañado de un aumento concomitante de IgA. Por contraste, solamente el 33 % de los pacientes muestra un aumento en los títulos de IgM durante la fase crónica.

Debe considerarse la posibilidad de reacciones cruzadas entre *Brucella* y *Yersinia enterocolitica* 09, *Francisella tularensis*, y *Vibrio cholerae*. También son posibles reacciones positivas después de una vacunación contra el cólera.

## 8.7 Intervalos de referencia de individuos sanos

Las pruebas de sueros de donantes de sangre elegidos al azar, recogidos en la región del sur de Alemania, con las pruebas de SERION ELISA *classic* *Brucella* IgA IgG e IgM dieron como resultado la distribución siguiente. De 180 sueros, 179 (99,4 %) fueron negativos cuando se ensayaron con la prueba de SERION ELISA *classic* *Brucella* IgG y una muestra (0,6 %) arrojó un resultado positivo. De 180 sueros ensayados con la prueba de SERION ELISA *classic* *Brucella* IgA, 180 (100 %) fueron negativos. Además, los resultados del ensayo de 180 sueros en la prueba de SERION ELISA *classic* *Brucella* IgM fueron como sigue; 178 sueros (98,9 %) ensayados fueron negativos, un suero (0,6 %) positivo y una (0,6 %) muestra fue de resultado dudoso. Esta distribución indica una tasa de seroprevalencia basal del 1 % en la población general.

## 9 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

### 9.1 Sensibilidad y especificidad

Para determinar las características de funcionamiento de SERION ELISA *classic* IgG, IgM e IgA, se ensayó en un estudio que utilizaba suero de 108 donantes de sangre sanos, 132 sueros de niños (pacientes ingresados en un hospital infantil), 44 sueros de pacientes ingresados con otras enfermedades y también 27 pacientes con brucelosis sospechada y se comparó con una prueba ELISA disponible comercialmente. Los resultados dudosos no se incluyeron en los cálculos de la sensibilidad y especificidad.

Características de funcionamiento	Sensibilidad	Especificidad
SERION ELISA <i>classic</i> <i>Brucella</i> IgA	> 99 %	> 99 %
SERION ELISA <i>classic</i> <i>Brucella</i> IgG	> 99 %	99,3%
SERION ELISA <i>classic</i> <i>Brucella</i> IgM	91,3%	> 99 %

## 9.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad intraensayo se determinó mediante ensayo de sueros de diferentes reactividades 20 veces en una carga de pruebas. La reproducibilidad interensayo se determinó mediante ensayo de sueros de diferentes reactividades en 10 cargas independientes de pruebas.

$$\text{Coeficiente de variación (CV \%)} = \frac{\text{Desviación típica}}{\text{Valor de la media}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Brucella IgA:

Muestra	Valor de la media (DO)	Intraensayo (CV %)	Valor de la media (DO)	Interensayo (CV %)
débilmente positivo	0,598	12,1	0,758	9,3
positivo	1,794	7,5	2,266	7,5
fuertemente positivo	-	-	3,415	1,2

### SERION ELISA classic Brucella IgG:

Muestra	Valor de la media (DO)	Intraensayo (CV %)	Valor de la media (DO)	Interensayo (CV %)
débilmente positivo	0,595	5,5	0,564	11,3
positivo	1,239	7,2	1,352	13,3
fuertemente positivo	-	-	1,941	6,4

### SERION ELISA classic Brucella IgM:


Muestra	Valor de la media (DO)	Intraensayo (CV %)	Valor de la media (DO)	Interensayo (CV %)
débilmente positivo	0,431	14,5	0,526	8,9
positivo	1,551	6,6	1,064	7,4
fuertemente positivo	-	-	1,983	7,0

## 10 MEDIDAS DE SEGURIDAD

### 10.1 Declaraciones de advertencia

El SERION ELISA *classic* está diseñado para ser utilizado por personal cualificado y familiarizado con las buenas prácticas de laboratorio.

Todos los reactivos del kit y las muestras humanas deben manipularse con cuidado, de acuerdo a la buena práctica de laboratorio establecida.

- Este kit contiene componentes de sangre humana. Aunque todos los sueros de control y de corte han sido analizados y el resultado ha sido negativo para anti-HIV-ab (anticuerpo anti VIH), HBs-Ag (*antígeno de superficie del virus de hepatitis B*) y anti-HCV-ab (anticuerpo anti VHC), se deberán considerar como potencialmente infecciosos.
- No pipetear con la boca.
- No fume, coma ni beba en zonas en las que se manipulen muestras o reactivos del kit.
- Utilice guantes desechables, bata de laboratorio y gafas de seguridad mientras manipula reactivos del kit o muestras. Lávese las manos a fondo después.
- El material del paciente y demás material potencialmente infeccioso se debe descontaminar después de la ejecución de la prueba.
- Los reactivos se deben conservar de modo seguro y deben ser inaccesibles a un acceso no autorizado p.ej., niños.
- Solución de parada:  corrosivo (C); produce quemadura ácida (R34)

¡Utilice gafas de seguridad, guantes y bata de laboratorio al manipular!

### 10.2 Eliminación

Cumpla con los requisitos reglamentarios pertinentes.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Araj, G.F., Lulu, A.R., Khateeb, M.I., Saadah, M.A., Shakir, R.A. (1988) ELISA versus routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. *APMIS* 96, 171-6.
- [2] Ariza, J., Pellicer, T., Pallares, R., Foz, A., Gudiol, F. (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 14, 131-40.
- [3] BgVV, RKI (1996) Brucellosen-Erkennung und Behandlung, Merkblatt für Ärzte.
- [4] Brouqui, P., Raoult, D. (2000) Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 177-207.
- [5] Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213-21.
- [6] Gad El-Rab, M. O., Kambal, A. M. (1998) Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. *J. Infect.* 36, 197-201.
- [7] Gazapo, E., Gonzalez Lahoz, J., Subiza, J.L., Baquero, M., Gil, J., de la Concha, E.G. (1989) Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. *J. Infect. Dis.* 159, 219-25.
- [8] Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., Pallares, R., Gudiol, F. (1988) Specific antibodies during relapse of human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 157, 918-24.
- [9] Yagupsky, P. (1999) Detection of Brucellae in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3437-42.



# Αναπροσαρμογές

Παρακαλώ δώστε προσοχή στις διαφορές σε σύγκριση με την προηγούμενη έκδοση.

Τρέχουσα έκδοση Αριθμ.: V 12.11/12-1

Προηγούμενη έκδοση: V 11.11/05-1

Αναπροσαρμογή στην παράγραφο: 5, 7.2.1

## SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

- 1 ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ
- 2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΧΕΤΙΚΟΤΗΤΑ
- 3 ΑΡΧΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA *classic*
- 4 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ
- 5 ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ
- 6 ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ
- 7 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA *classic*
  - 7.1 Ενδείξεις ελάττωσης ποιότητας
  - 7.2 Προετοιμασία δείγματος και φύλαξη
  - 7.3 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων του κιτ
  - 7.4 Επισκόπηση - Διαδικασία δοκιμασίας
  - 7.5 Χειροκίνητη διαδικασία δοκιμασίας
  - 7.6 Αυτόματη διαδικασία δοκιμασίας
  - 7.7 Θετικός έλεγχος/ Έλεγχος ακρίβειας
- 8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ
  - 8.1 Ποσοτικό προσδιορισμός με τη μέθοδο 4PL
  - 8.2 Κριτήρια ισχύος δοκιμασίας
  - 8.3 Υπολογισμός SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Όρια ποσοτικού προσδιορισμού
  - 8.5 Εύρος οριακών τιμών
  - 8.6 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων
  - 8.7 Εύρος αναφοράς υγιών ατόμων
- 9 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
  - 9.1 Ευαισθησία και Ειδικότητα
  - 9.2 Επαναληψιμότητα
- 10 ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ
  - 10.1 Προειδοποιήσεις/ Προφυλάξεις
  - 10.2 Διάθεση
- 11 ΑΝΑΦΟΡΕΣ



# SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

## Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για ανίχνευση ανθρώπινων αντισωμάτων για διαγνωστική χρήση *in vitro*

SERION ELISA *classic* Brucella IgA

Αριθμ. Παραγγελίας: ESR116A

SERION ELISA *classic* Brucella IgG

Αριθμ. Παραγγελίας: ESR116G

SERION ELISA *classic* Brucella IgM

Αριθμ. Παραγγελίας: ESR116M

### 1 ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Οι δοκιμασίες SERION ELISA *classic* Brucella IgA, IgG και IgM είναι ποσοτικές και ποιοτικές ανοσολογικές μέθοδοι για την ανίχνευση ανθρώπινων αντισωμάτων στο ορό ή το πλάσμα, τα οποία κατευθύνονται ενάντια σε παθογόνα για τον άνθρωπο είδη βρουκέλλας. Η αξιολόγηση των εξατομικευμένων κατηγοριών ανοσοσφαιρινών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της επαφής παθογόνων και του σταδίου της νόσου.

### 2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΧΕΤΙΚΟΤΗΤΑ

Τα είδη βρουκέλλας είναι gram-αρνητικά βακτηρίδια, τα οποία ζουν σε ένα μεγάλο φάσμα ζώων ως ενδοκυτταρικά παράσιτα. Οι λοιμώξεις στον άνθρωπο προκαλούνται κυρίως από *Brucella melitensis* (μελιταίος πυρετός), *Brucella abortus* («νόσος Bang») και *Brucella suis*. Το παθογόνο μεταδίδεται μέσω επαφής με μολυσμένα ζώα (ζωονοσία), τα κόπρανα αυτών, και μέσω μολυσμένων τροφίμων, ιδιαίτερα μη παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η νόσος ξεκινάει με γενικά συμπτώματα τα οποία εξελίσσονται σε ήπιο πυρετό κατά την έναρξη της οξείας φάσης, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση του πυρετού τις απογευματινές ώρες, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία ή διόγκωση λεμφαδένων. Ο πυρετός με διακυμάνσεις και ενδιάμεσα απύρετα διαστήματα είναι χαρακτηριστικός για τις λοιμώξεις με μελιταίο πυρετό (*Brucella melitensis*) και *Brucella suis*.

Η νόσος μπορεί να αποθεραπευτεί ξαφνικά ή να περάσει σε ένα χρόνιο στάδιο με ποικίλα συμπτώματα. Κατά την χρόνια πορεία παρατηρείται εγκατάσταση της νόσου σε πολλαπλά όργανα ή συστήματα οργάνων, οστά ή αρθρώσεις. Ιστολογικά διακρίνονται χαρακτηριστικά κοκκιώματα στους μολυσμένους ιστούς.

Η βακτηριαδική ενδοκαρδίτιδα γίνεται μοιραία εάν δε θεραπευτεί. Κατά τη διάρκεια του προχωρημένου σταδίου της βρουκέλλωσης είναι δυνατό να εμφανιστούν νευρολογικά όπως επίσης και ψυχιατρικά συμπτώματα.

Ως διαφορική διάγνωση θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν οι ακόλουθες παθήσεις: *κοιλιακός τύφος*, λέμφωμα, φυματίωση, τουλαραιμία, βορρελίωση, ιογενής ηπατίτιδα, γρίπη

Λόγω της άτυπης κλινικής εικόνας της χρόνιας βρουκέλλωσης, μπορεί η διάγνωση να γίνει αποκλειστικά και μόνον με τον άμεσο εντοπισμό των λοιμογόνων βακτηριδίων ή με τον καθορισμό της ειδικής απάντησης αντισωμάτων στον ορό του ασθενή ή στο ENY. Ο άμεσος εντοπισμός των παθογόνων με την βοήθεια καλλιέργειας μπορεί να γίνει με

παρακέντηση από αίμα, μυελού των οστών ή αρθρώσεων ή δείγμα ούρων, όμως οι ιδιαίτερες θρεπτικές απαιτήσεις της βορέλλιας το καθιστούν αυτό δύσκολο και περιορίζουν την ανίχνευσή της μόνο από ειδικά εργαστήρια. Γρηγορότερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τη χρήση ορολογικών μεθόδων όπως οι δοκιμασίες συγκόλλησης ή δοκιμασίες δέσμευσης συμπληρώματος. Για τη διαφοροποίηση μεταξύ οξείας και χρόνιας βρουκέλλωσης, η μέθοδος επιλογής είναι η ELISA, η οποία παρέχει ευαισθησία, εξειδίκευση και τη δυνατότητα διαφοροποίησης μεταξύ IgA, IgG και IgM.

### **3 ΑΡΧΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA *classic***

Το ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) είναι μία ανοσολογική μέθοδος, η οποία είναι ειδικά προσαρμοσμένη για τον προσδιορισμό αντισωμάτων στο πεδίο της λοιμωξιολογικής ορολογίας. Η αντίδρασης βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους. Οι ταινίες της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* πλάκα μικροπιλοποίησης είναι επικαλυμμένες με ειδικά αντιγόνα του παθογόνου ενδιαφέροντος. Εάν υπάρχουν αντισώματα στον ορό του δείγματος του ασθενή, αυτά συνδέονται με το σταθερό αντιγόνο. Ένα δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο έχει συμπλεγθεί με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, ανιχνεύει και συνδέεται με το ανοσολογικό σύμπλεγμα. Το άχρωμο υπόστρωμα p-νιτροφαινολοφωσφορικό μετατρέπεται έπειτα στο έγχρωμο προϊόν p-νιτροφαινόλη. Η ένταση του σήματος αυτού του προϊόντος αντίδρασης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα και μετράται φωτομετρικά.



#### 4 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ

Συστατικά της δοκιμασίας	Τεμάχια / Όγκος
<b>Αποσπάσιμες ταινίες δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης με οκτώ επικαλυμμένες με αντιγόνο μεμονωμένες κοιλότητες.</b> (συνολικά 96) <b>[MTP]</b> , 1 πλαίσιο δοκιμασίας. Το υλικό επικάλυψης είναι απενεργοποιημένο.	12 τεμάχια
<b>Πρότυπος ορός (έτοιμος προς χρήση) <b>[STD]</b>,</b> Ανθρώπινος ορός σε πρωτεϊνούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, αρνητικό για αντίσωμα αντι-HIV, αντιγόνο HBs (αντιγόνο επιφάνειας ηπατίτιδας Β) και αντίσωμα αντι-HCV; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, χρωστική: Αμαράνθη Ο.	2 x 2 ml
<b>Αρνητικός ορός ελέγχου (έτοιμος προς χρήση) <b>[NEG]</b>,</b> Ανθρώπινος ορός σε πρωτεϊνούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, αρνητικό για αντίσωμα αντι-HIV, αντιγόνο HBs (αντιγόνο επιφάνειας ηπατίτιδας Β) και αντίσωμα αντι-HCV; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, χρωστική: Πράσινη λισσαμίνη V.	2 ml
<b>Αντι-ανθρώπινη IgA, IgG ή IgM σύζευξη (έτοιμη προς χρήση) <b>[APC]</b>,</b> Αντι ανθρώπινο IgA, IgG ή IgM πολυκλωνικό αντίσωμα, συζευγμένο σε αλκαλική φωσφατάση, σταθεροποιημένο σε πρωτεϊνούχο διάλυμα, συντηρητικό: 0.01 % μεθυλισοθειαζολιόνη, 0.01 % βρωμονιτροδιοξάνιο.	13 ml
<b>Συμπύκνωμα διαλύματος πλύσης (επαρκές για 1000 ml) <b>[WASH]</b>,</b> Χλωριούχο νάτριο με Tween 20 και 30 mM Tris/HCl, pH 7,4; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου,	33,3 ml
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης <b>[DILB]</b>,</b> Πρωτεϊνούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με Tween 20; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, χρωστική: 0.01 g/l κυανού της βρωμοφαινόλης.	2 x 50 ml
<b>Διάλυμα διακοπής <b>[STOP]</b>,</b> 1.2 N υδροξείδιο του νατρίου	15 ml
<b>Υπόστρωμα (έτοιμο προς χρήση) <b>[pNPP]</b>,</b> Παρα-νιτροφαινολφοσφορικό σε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς διαλύτη, συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, (Το υπόστρωμα είναι δυνατό να έχει μία ελαφρώς κίτρινη απόχρωση στην κλειστή φιάλη, πράγμα το οποίο δε μειώνει την ποιότητα του προϊόντος!)	13 ml
<b>Δίπλωμα ελέγχου ποιότητας με πρότυπη καμπύλη και πίνακα τιμών <b>[INFO]</b>,</b> (ποσοτικός προσδιορισμός αντισωμάτων σε IU/ml ή U/ml).	2 σελίδες

## 5 ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ

- κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός
- για την ανίχνευση IgM: απορροφητικό Rf SERION , αριθμ. παραγγελίας Z200 (20 ml)
- φωτόμετρο για πλάκες μικροτιτλοποίησης με φίλτρο, μήκος κύματος 405 nm, συνιστώμενο μήκος κύματος αναφοράς 620 nm - 690 nm (π.χ. 650 nm)
- επωαστήρας 37 °C
- θάλαμος υγρασίας
- αποσταγμένο νερό
- Συνδετήρες Click (αριθμ. παραγγελίας VT120)

## 6 ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Αντιδραστήριο	Φύλαξη	Σταθερότητα
Ταινίες μικροτιλοποίησης (επικαλυμμένες με αντιγόνο)	κλειστό  μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C σε κλειστό περιέκτη αλουμινίου με αποξηραντικό μέσο  <i>Ταινίες οι οποίες δε χρησιμοποιούνται πρέπει να φυλάσσονται στον κλειστό περιέκτη αλουμινίου σε ξηρό περιβάλλον.</i>	βλέπε ημερομηνία λήξης,  ελάχιστη διάρκεια ζωής τέσσερις εβδομάδες  διάρκεια ζωής σε περίπτωση ορθής χρήσης και φύλαξης μέχρι την ημερομηνία λήξης
Οροί ελέγχου / Πρότυποι οροί	΄μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C	βλέπε ημερομηνία λήξης,  24 μήνες από την παραγωγή
Σύζευξη	έτοιμο προς χρήση διάλυμα στους 2 – 8 °C <i>Αποφύγετε την μόλυνση π.χ. με τη χρήση αποστειρωμένων άκρων προχοϊδων.</i>	βλέπε ημερομηνία λήξης,  28 μήνες από την παραγωγή
Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Κλειστό  ΄μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C  Απορρίψτε θολά διαλύματα.	βλέπε ημερομηνία λήξης,  36 μήνες από την παραγωγή  24 μήνες
Διάλυμα πλύσης	Συμπύκνωμα μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C αραίωση εργασίας στους 2 – 8 °C αραίωση εργασίας σε θερμοκρασία δωματίου Οι φιάλες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αραίωση εργασίας θα πρέπει να καθαρίζονται τακτικά. Απορρίψτε θολά διαλύματα.	βλέπε ημερομηνία λήξης,  2 εβδομάδες  1 εβδομάδα
Υπόστρωμα	έτοιμο προς χρήση διάλυμα στους 2 – 8 °C, φυλάσσεται προστατευμένο από το φως <i>Αποφύγετε την μόλυνση π.χ. με τη χρήση αποστειρωμένων άκρων προχοϊδων.</i>  Απορρίψτε εάν το διάλυμα χρωματιστεί κίτρινο (απορρόφηση έναντι αποσταγμένου ύδατος . > 0.25 OD).	βλέπε ημερομηνία λήξης,  36 μήνες από την παραγωγή
Διάλυμα διακοπής	Μετά από το άνοιγμα σε θερμοκρασία δωματίου	βλέπε ημερομηνία λήξης,

## 7 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA *classic*

### 7.1 Ενδείξεις ελάττωσης ποιότητας

Να χρησιμοποιείτε μόνο αντιδραστήρια SERION ELISA *classic* όταν χρησιμοποιείτε τις ανοσολογικές δοκιμασίες SERION ELISA *classic*. Τα συστατικά στοιχεία δεν πρέπει να αντικαθιστώνται από αντιδραστήρια άλλων κατασκευαστών. Οι πρότυποι οροί και οι οροί ελέγχου των ανοσολογικών δοκιμασιών SERION ELISA *classic* έχουν οριστεί ειδικά για το κιτ δοκιμασίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με άλλες παρτίδες. Το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης, το διάλυμα πλύσης, το υπόστρωμα και το διάλυμα διακοπής μπορούν να χρησιμοποιηθούν με όλες τις ανοσολογικές δοκιμασίες SERION ELISA *classic* ανεξαρτήτως παρτίδας και δοκιμασίας.

Υπάρχουν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις σύζευξης για κάθε κατηγορία ανοσοσφαιρίνης: ΧΑΜΗΛΗ, ΜΕΣΗ, ΥΨΗΛΗ Η ταξινόμηση αναγράφεται σε κάθε ετικέτα ως εξής:

π.χ.	IgG +	χαμηλής συγκέντρωσης σύζευξη IgG
	IgG ++	μέσης συγκέντρωσης σύζευξη IgG
	IgG +++	υψηλής συγκέντρωσης σύζευξη IgG

σε σπάνιες περιπτώσεις απαιτείται η χρήση ειδικής σύζευξης ώστε να εξασφαλίζεται η σταθερή ποιότητα των προϊόντων μας. Οι ειδικές συζεύξεις παράγονται σε ανεξάρτητη παρτίδα και δεν φέρουν το σήμα “+” και δεν ανταλλάσσονται με άλλες συζεύξεις.

Παρακαλώ δώστε ιδιαίτερη προσοχή στις πληροφορίες που αναγράφονται στις ετικέτες!

Σε κλειστή συσκευασία, όλα τα συστατικά στοιχεία των δοκιμασιών SERION ELISA *classic*, μπορούν, όταν φυλάσσονται αναλόγως, να χρησιμοποιηθούν μέχρι και την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στις ετικέτες. Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά από την ημερομηνία λήξης.

Αραίωση εναλλαγή των αντιδραστηρίων είναι δυνατό να προκαλέσουν απώλεια της ευαισθησίας.

Αποφύγετε την έκθεση των αντιδραστηρίων σε έντονο φως κατά τη διάρκεια της φύλαξης και επώασης. Τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται καλά κλεισμένα μετά από τη χρήση, ώστε να αποφεύγονται η εξάτμιση και η μόλυνσή τους.

Για να ανοίξετε τον περιέκτη αλουμινίου της πλάκας μικροτιτλοποίησης κόψτε μόνο την κορυφή στη σηματοδοτημένη πλευρά, ώστε να μπορεί να ξανακλείσει κατάλληλα. Μη χρησιμοποιείτε τις ταινίες εάν ο περιέκτης αλουμινίου έχει υποστεί βλάβη ή εάν ο περιέκτης με τις υπολειπόμενες ταινίες δεν έχει ξανακλείσει σωστά.

Χρησιμοποιείτε άσηπτες τεχνικές όταν απομακρύνετε τμήματα από τους σωληνίσκους αντιδραστηρίων ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση. Για να αποφευχθούν ψευδώς θετικά

αποτελέσματα, εξασφαλίστε ότι δεν ακουμπάτε ή πιπιλάτε τα άνω τοιχώματα των κοιλοτήτων κατά το πιπετάρισμα της σύζευξης. Προσέχετε να μη ανταλλάσετε τα καπάκια των φιαλών και/ ή φιαλιδίων.

Η δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας εξαρτάται από τη λεπτομερή μίξη των αντιδραστηρίων . Ανακινείστε τις φιάλες που περιέχουν τους ορούς ελέγχου πριν από τη χρήση και επίσης όλα τα δείγματα μετά από την αραίωση (π.χ. με τη χρήση ενός αναμίκτη vortex).

Βεβαιωθείτε ότι πιπετάρτε προσεκτικά και σύμφωνα με τους δεδομένους χρόνους και τις θερμοκρασίες επώασης . Σημαντικές χρονικές διαφορές μεταξύ του πιπεταρίσματος της πρώτης και της τελευταίας κοιλοτήτας της πλάκας μικροπιλοποίησης όταν διανέμονται δείγματα και οροί ελέγχου, η σύζευξη ή το υπόστρωμα είναι δυνατό να οδηγήσουν σε διαφορετικούς χρόνους προεπώασης, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια και τη δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων.

Τα βέλτιστα αποτελέσματα μπορούν να επιτευχθούν μόνο εάν τηρούνται αυστηρά οι οδηγίες.

Η ανοσολογική μέθοδος SERION ELISA *classic* ισχύει μόνο εάν εκπληρώνονται τα ειδικά για την παρτίδα κριτήρια επικύρωσης στο πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου.

Η επαρκής πλύση αποφεύγει τις μη ειδικεύσεις της δοκιμασίας. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία πλύσης θα πρέπει να διεξάγεται προσεκτικά. Όλες οι κοιλοότητες στον επίπεδο πυθμένα θα πρέπει να πληρώνονται με όμοιους όγκους ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Στο τέλος της διαδικασίας εξασφαλίστε ότι οι κοιλοότητες είναι πλήρως ελεύθερες από ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης προκειμένου να αποφευχθούν ανεξέλεγκτες επιδράσεις αραίωσης. Αποφύγετε τη δημιουργία αφρού!

Δώστε προσοχή να μην προκαλέσετε βλάβη στην επιγραφή (παθογόνο/ κατηγορία αντισωμάτων) στις ταινίες δοκιμασίας μικροπιλοποίησης κατά τη διάρκεια της πλύσης και αναρρόφησης ώστε να αποφευχθεί η σύγχυση.

## **7.2 Προετοιμασία δείγματος και φύλαξη**

Λιπαιμικά, αιμολυμένα ή ικτερικά δείγματα (ορός ή πλάσμα) θα πρέπει να δοκιμάζονται μόνο με προσοχή. Τα προφανώς μολυσμένα δείγματα δεν πρέπει να δοκιμάζονται. Ο ορός ή το πλάσμα (EDTA, κιτρικό άλας, ηπαρίνη) που συλλέγονται σύμφωνα με τις πρότυπες εργαστηριακές μεθόδους είναι κατάλληλα δείγματα. Τα δείγματα δεν πρέπει να απενεργοποιούνται θερμικά.

### 7.2.1 Αραίωση των δειγμάτων

Πριν τη διενέργεια της δοκιμασίας, τα δείγματα του ασθενή ( $V_1$ ) πρέπει να αραιώνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ( $V_2$ ) ως εξής:

#### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	προσθήκη	10 μl	δείγμα ασθενή
	σε κάθε	1000 μl	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης

Μετά από την αραίωση πριν το πιπετάρισμα στην πλάκα μικροτιτλοποίησης πρέπει τα δείγματα πρέπει να αναμιγνύονται καλά, ώστε να προκύπτει ένα ομοιογενές διάλυμα.

#### SERION ELISA *classic* Brucella IgM

##### Αλληλεπίδραση με τους ρευματοειδής παράγοντες

Οι ρευματοειδής παράγοντες είναι αυτοαντισώματα, κυρίως της ομάδας IgM, τα οποία συνδέονται κατά προτίμηση με τα IgG σε ανοσολογικά συμπλέγματα. Η παρουσία μη ειδικών αντισωμάτων IgM (ρευματοειδής παράγοντες) είναι δυνατό να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα στη δοκιμασία IgM. Επιπλέον, υπάρχει η πιθανότητα, αυτά τα ασθενώς συνδεδεμένα ειδικά παθογόνα αντισώματα IgM να εκτοπιστούν από ισχυρότερα δεσμευμένα αντισώματα IgG οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα IgM. Επομένως είναι απαραίτητο να επεξεργάζονται εκ των προτέρων τα δείγματα με απορροφητή του ρευματοειδή παράγοντα πριν από την ανίχνευση IgM (Απορροφητής ρευματοειδή παράγοντα (SERION, Αριθμ. παραγγελίας: Z200 (20 ml/100 δοκιμασίες)). Η απορρόφηση Rf (ρευματοειδή παράγοντα) εκτελείται μέσω επώασης του δείγματος του ασθενή σε ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή κατά τη διάρκεια της νύχτας σε 4 °C. Η διαδικασία της δοκιμασίας περιγράφεται σε ένα ξεχωριστό εγχειρίδιο οδηγιών.

Πριν τη διενέργεια της δοκιμασίας, ο απορροφητής ρευματοειδή παράγοντα ( $V_1$ ) πρέπει να αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ( $V_2$ ):

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	προσθήκη	200 μl	Απορροφητής Rf
	σε κάθε	800 μl	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης

Τα δείγματα ασθενών ( $V_4$ ) πρέπει να αραιώνονται σε αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα Rf ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	προσθήκη	10 μl	δείγμα ασθενή
	σε κάθε	1000 μl	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης

Μετά από την αραίωση πριν το πιπετάρισμα στην πλάκα μικροτιτλοποίησης πρέπει τα δείγματα πρέπει να αναμιγνύονται καλά, ώστε να προκύπτει ένα ομοιογενές διάλυμα.

### 7.2.2 Φύλαξη δειγμάτων

Τα δείγματα ασθενών δεν πρέπει να φυλάσσονται πάνω από 7 ημέρες στους 2 – 8 °C. Παρατεταμένη φύλαξη είναι δυνατή ≤ -20 °C. Αποφύγετε επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη των δειγμάτων. Αραιωμένα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους 2 – 8 °C για μία εβδομάδα.

### 7.3 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων του kit

Προσαρμόστε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη δοκιμασία.

#### 7.3.1 Ταινίες δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης

Οι ταινίες δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης σε πλαίσια είναι συσκευασμένες με ένα αποξηραντικό μέσο σε έναν περιέκτη αλουμινίου. Πάρτε τις μη απαιτούμενες κοιλότητες από το πλαίσιο και τις επανατοποθετήστε τις στον περιέκτη αλουμινίου. Κλείστε τον περιέκτη προσεκτικά για να εξασφαλίσετε αεροστεγείς συνθήκες.

#### 7.3.2 Οροί ελέγχου / Πρότυποι οροί

Οι οροί ελέγχου και οι πρότυποι οροί είναι έτοιμοι προς χρήση και δεν πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω. Για κάθε κύκλο δοκιμασίας – ανεξαρτήτως του αριθμού ταινιών δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης που χρησιμοποιούνται – πρέπει να συμπεριλαμβάνονται οι οροί ελέγχου και οι πρότυποι οροί. Οι πρότυποι οροί πρέπει να τοποθετούνται εις διπλούν .

Μην επεξεργάζεστε τους ορούς ελέγχου με απορροφητή Rf (ρευματοειδή παράγοντα).

#### 7.3.3 Αντι-ανθρώπινη IgA, IgG ή IgM σύζευξη AP (έτοιμη προς χρήση),

Συζεύξεις με την ίδια συγκέντρωση και της ίδιας κατηγορίας ανοσοσφαιρινών είναι ανταλλάξιμες. Αποφύγετε τη μόλυνση συζεύξεων έτοιμες προς χρήση π.χ. χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα άκρα (προχοϊδων).

#### 7.3.4 Διάλυμα πλύσης

Αραιώστε το συμπύκνωμα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ( $V_1$ ) 1:30 με αποσταγμένο νερό σε τελικό όγκο  $V_2$ .

Παράδειγμα:

Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος ( $V_1$ )	Τελικός όγκος ( $V_2$ )
33,3 ml	1.000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης για δείγματα (έτοιμο προς χρήση)

#### 7.3.6 Υπόστρωμα (έτοιμο προς χρήση)

Αποφύγετε τη μόλυνση διαλυμάτων υποστρώματος έτοιμα προς χρήση π.χ. χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα άκρα (προχοϊδων).

#### 7.3.7 Διάλυμα διακοπής (έτοιμο προς χρήση)

## 7.4 Επισκόπηση - Διαδικασία δοκιμασίας

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM ποσοτική

Σε περίπτωση ανίχνευσης IgM απορρόφηση ρευματοειδή παράγοντα, βλέπε αριθμ. 7.2.1;  
Επώαση 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C

αραίωση δείγματος dilution<sup>1</sup>  
(δείγματα ασθενών)  
1+100

Πιπετάρετε αραιωμένα δείγματα και έτοιμο προς χρήση ορό ελέγχου/  
πρότυπο ορό στις κοιλότητες της μικροδοκιμασίας (100 μl)



ΕΠΩΑΣΗ 60 Min./ 37 °C  
θάλαμος υγρασίας



ΠΛΥΣΗ (4 x 300 μl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Πιπετάρετε διάλυμα σύζευξης [APC] (100 μl)



ΕΠΩΑΣΗ 30 Min./ 37 °C  
θάλαμος υγρασίας



ΠΛΥΣΗ (4 x 300 μl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Πιπετάρετε διάλυμα υποστρώματος [pNPP] (100 μl)



ΕΠΩΑΣΗ 30 Min./ 37 °C  
θάλαμος υγρασίας



Πιπετάρετε διάλυμα διακοπής [STOP] (100 μl)



ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ στα 405 nm

<sup>1</sup>Ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα αραίωσης για τις παρακάτω δοκιμασίες SERION ELISA *classic*:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Παρβοϊός B19 IgM και ιός Hanta Puumala IgG, IgM

<sup>2</sup>Για χειροκίνητη χρήση:  
χτυπήστε την πλάκα στο τέλος της διαδικασίας πλύσης σε μία χαρτοπετσέτα.



## 7.5 Χειροκίνητη διαδικασία δοκιμασίας

1. Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό **κοιλοτήτων στο πλαίσιο** και προετοιμάστε ένα φύλλο πρωτοκόλλου .
2. Προσθέστε από **100 μl αραιωμένου δείγματος ή έτοιμο προς χρήση έλεγχο** στις κατάλληλες κοιλότητες των ταινιών της δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης. Αφήστε μία κοιλότητα κενή για το υπόστρωμα, π.χ. .:

IgA/IgG/IgM ποσοτική Κοιλότητα αριθμ.	
κοιλότητα A1	Υπόστρωμα ελεύθερο
Κοιλότητα B1	Αρνητικός έλεγχος
Κοιλότητα C1	Πρότυπος ορός
Κοιλότητα D1	Πρότυπος ορός
Κοιλότητα E1	Ασθενής 1....

3. **Επώαση δείγματος** για 60 λεπτά (+/- 5 min) στους 37 °C (+/- 1 °C) σε θάλαμο υγρασίας
4. Μετά από την επώαση **πλύνετε** όλες τις κοιλότητες με διάλυμα πλύσης (με αυτόματο πλύσης ή χειροκίνητα).
  - αναρροφήστε ή αδειάστε με ανακίνηση το διάλυμα επώασης.
  - γεμίστε κάθε κοιλότητα με 300 μl διάλυμα πλύσης
  - αναρροφήστε ή αδειάστε με ανακίνηση το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.
  - επαναλάβετε τη διαδικασία πλύσης 3 φορές (συνολικά 4 φορές!)
  - στεγνώστε χτυπώντας την πλάκα μικροτιτλοποίησης σε μία χαρτοπετσέτα
5. **Προσθήκη της σύζευξης**  
Προσθέστε 100 μl από την έτοιμη προς χρήση σύζευξη IgA/IgG/IgM στις κατάλληλες κοιλότητες (εξαίρεση κενό υποστρώματος)
6. **Επώαση σύζευξης** για 30 λεπτά (+/- 1 min) στους 37 °C (+/- 1 °C) σε θάλαμο υγρασίας
7. Μετά από την επώαση **πλύνετε** όλες τις κοιλότητες με διάλυμα πλύσης (βλέπε παρακάτω)
8. **Προσθήκη του υποστρώματος**  
Προσθέστε 100 μl έτοιμο προς χρήση διάλυμα υποστρώματος σε κάθε κοιλότητα (συμπεριλαμβανομένου κενό υποστρώματος!)
9. **Επώαση υποστρώματος** για 30 λεπτά (+/- 1 min) στους 37 °C (+/- 1 °C) σε θάλαμο υγρασίας
10. **Διακοπή της αντίδρασης**  
Προσθέστε 100 μl διάλυμα διακοπής σε κάθε κοιλότητα, ανακινείστε ελαφρά την πλάκα μικροτιτλοποίησης για ανάμιξη.
11. **Ανάγνωση απορρόφησης**  
Διαβάστε την οπτική πυκνότητα (OD) εντός 60 λεπτών στα 405 nm έναντι κενού υποστρώματος, μήκος κύματος αναφοράς μεταξύ 620 nm και 690 nm (π.χ. 650 nm).

\* Παρακαλώ λάβετε υπόψη ότι υπό ειδικές συνθήκες εργασίας, ίσως να είναι απαραίτητες εσωτερικές εργαστηριακές προσαρμογές.

## 7.6 Αυτόματη διαδικασία δοκιμασίας

Το SERION ELISA είναι προσαρμοσμένο για την επεξεργασία σε αυτόματα μηχανήματα και ρυθμισμένα για τη χρήση με Immunomat™ καθώς επίσης και με DYNEX DSX® και DS2®. Η αυτόματη διαδικασία είναι ανάλογα σχεδιασμένη με τη χειροκίνητη χρήση. Παρακαλώ λάβετε υπόψη ότι υπό ειδικές συνθήκες εργασίας, ίσως να είναι απαραίτητες εσωτερικές εργαστηριακές προσαρμογές.

## 7.7 Θετικός έλεγχος/ Έλεγχος ακρίβειας

Για την περιοδική επαλήθευση της μεθόδου δοκιμασίας, προκειμένου να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις συστημάτων διαχείρισης εσωτερική εργαστηριακής ποιότητας, συνιστούμε τη χρήση ελέγχων SERION ELISA *controls* για τον καθορισμό ακρίβειας και αξιοπιστίας των κύκλων δοκιμασίας SERION ELISA *classic*. Η χρήση ελέγχων SERION ELISA *controls* περιγράφεται σε ειδικά εγχειρίδια οδηγιών.

## 8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Ποσοτικό προσδιορισμός με τη μέθοδο 4PL

Η βελτιστοποιημένη απονομή σημάτων απορρόφησης στις ποσοτικές τιμές εξασφαλίζεται με τη χρησιμοποίηση μη γραμμικών λειτουργιών, οι οποίες ρυθμίζουν μια σιγμοειδή καμπύλη χωρίς περαιτέρω μετασχηματισμό στις τιμές οπτικής πυκνότητας (OD). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων αντισωμάτων με το SERION ELISA *classic* διενεργείται με το μοντέλο λογιστικής 4 παραμέτρων (4 PL) το οποίο είναι ιδανικό για την ακριβή προσαρμογή της καμπύλης. Βασίζεται στον τύπο:

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{Conc.})}}$$

Οι παράμετροι A, B, C, και D είναι αντιπροσωπευτικές για την ακριβή μορφή της καμπύλης:

- |                          |                |
|--------------------------|----------------|
| 1. χαμηλότερη ασύμπτωτος | ⇒ παράμετρος A |
| 2. κλίση της καμπύλης    | ⇒ παράμετρος B |
| 3. σημείο καμπής         | ⇒ παράμετρος C |
| 4. ανώτερη ασύμπτωτος    | ⇒ παράμετρος D |

Για κάθε παρτίδα η πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται από το Ινστιτούτο Virion\Serion ΕΠΕ (Würzburg, Γερμανία) σε επαναλαμβανόμενους κύκλους δοκιμασίας υπό ιδανικές συνθήκες. Δεν απαιτείται κατανάλωση χρόνου και πολύ δαπανηρή κατασκευή πρότυπης καμπύλης από το χρήστη.

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων αντισωμάτων μίας ειδικής για την παρτίδα πρότυπης καμπύλης καθώς επίσης και ενός ειδικού για την καμπύλη πίνακα υπολογισμού συμπεριλαμβάνονται σε κάθε κιτ δοκιμασίας SERION ELISA *classic*. Το λογισμικό υπολογισμού SERION *evaluate* όπως και το εργαλείο λογισμικού της Microsoft® βασισμένο σε Excel, SERION *activity* διατίθενται κατόπιν αιτήσεως .

Για την εξισορρόπηση των φυσιολογικών εναλλαγών της δοκιμασίας και για τον έλεγχο της ποιότητας του κύκλου της δοκιμασίας χρησιμοποιείται σε κάθε μεμονωμένο κύκλο δοκιμασίας ένας πρότυπος ορός. Για αυτόν τον ορό ελέγχου προσδιορίζεται μία τιμή αναφοράς με εύρος ισχύος στον ποιοτικό έλεγχο του κατασκευαστή. Εντός αυτών των ορίων εξασφαλίζεται ο ορθός ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης αντισωμάτων.

## 8.2 Κριτήρια ισχύος δοκιμασίας

- Το κενό υπόστρωμα πρέπει να είναι  $< 0.25$  OD.
- Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να παράγει αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας.
- Κατά τη χρήση ποσοτικών δοκιμασιών SERION ELISA *classic* η μέση τιμή OD (μετά από την αφαίρεση του κενού υποστρώματος!) του πρότυπου ορού πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους ισχύος, το οποίο ορίζεται στο πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου ειδικό για την παρτίδα.
- Η μεταβολή των τιμών OD του πρότυπου ορού ή δεν μπορεί να είναι υψηλότερη από 20 %.

Εάν δεν τηρούνται αυτά τα κριτήρια, η δοκιμασία δεν έχει ισχύ και πρέπει να επαναλαμβάνεται.

## 8.3 Υπολογισμός SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Μη- αυτόματος υπολογισμός

Για τον υπολογισμό της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* ένα πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου ειδικό για την παρτίδα με πρότυπη καμπύλη και έναν πίνακα υπολογισμού συμπεριλαμβάνεται στο κιτ δοκιμασίας έτσι ώστε οι αποκτηθείσες τιμές OD μπορούν να οριστούν στις αντίστοιχες δραστηριότητες αντισωμάτων. Το κενό υποστρώματος πρέπει να αφαιρείται από όλες τις τιμές OD πριν από τον υπολογισμό.

#### Μέθοδος 1: Ποιοτικός υπολογισμός

Για τον καθορισμό του εύρους cut-off πολλαπλασιάζεται η μέση τιμή της μετρημένου πρότυπης OD με τα αριθμητικά στοιχεία του πιστοποιητικού ποιοτικού ελέγχου (βλ. τους ειδικούς τύπους περίπτωσης), π.χ.:

OD =  $0.502 \times MW(STD)$  με ανώτερο cut-off

OD =  $0,352 \times MW(STD)$  με χαμηλότερο cut-off

Εάν η μετρημένη μέση αξία απορρόφησης του πρότυπου ορού είναι 0,64 OD, το εύρος του cut-off είναι μεταξύ 0.225-0.321 OD.

## Μέθοδος 2:

Συνεχής προσδιορισμός δραστηριοτήτων αντισωμάτων χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη

Οι αποκαλούμενες παραλλαγές διαδοκιμασίας (αποκλίσεις ημέρα με την ημέρα και αποκλίσεις από εργαστήριο σε εργαστήριο) αντισταθμίζονται με τον πολλαπλασιασμό της τρέχουσας μετρημένης αξίας που λαμβάνεται από το δείγμα ενός ασθενή με τον παράγοντα F. Αυτός ο παράγοντας υπολογίζεται ως εξής :

$$F = \frac{\text{OD-τιμή αναφοράς (του πρότυπου ορού)}}{\text{OD-τρέχουσα τιμή (του πρότυπου ορού)}}$$

Η διαδικασία είναι απαραίτητη για να ρυθμιστεί το τρέχον επίπεδο δοκιμασίας του χρήστη με την πρότυπη καμπύλη, ειδική για την παρτίδα. Αρχικά, πρέπει οι καθημερινές αποκλίσεις να διορθώνονται υπολογίζοντας το διορθωτικό παράγοντα F.

1. Ο μέσος όρος των δύο τιμών OD του πρότυπου ορού πρέπει να υπολογίζεται και να επιβεβαιώνεται ότι βρίσκεται εντός του δεδομένου εύρους ισχύος.
2. Υπολογισμός του παράγοντα F: Η δεδομένη τιμή αναφοράς διαιρείται με τη μέση τιμή της απορρόφησης του πρότυπου ορού:  
 $F = \text{τιμή αναφοράς απορρόφησης STD ορού} / \text{μέση τιμή απορρόφησης STD ορού}.$
3. Όλες οι μετρημένες τιμές των δειγμάτων ασθενή πολλαπλασιάζεται με τον παράγοντα F.
4. Οι δραστηριότητες αντισωμάτων σε IU/ml ή U/ml μπορούν να προσδιοριστούν από την πρότυπη καμπύλη με τις διορθωμένες τιμές.

### 8.3.2 Αυτόματος υπολογισμός δοκιμασίας με λογισμικό SERION *evaluate*

Μετά από την εισαγωγή των τεσσάρων παραμέτρων και την τιμή αναφοράς του πρότυπου ορού, οι δραστηριότητες αντισωμάτων υπολογίζονται on-line από επεξεργασμένη και μετρημένη δοκιμασία SERION ELISA *classic*, που τρέχει με τον υπολογισμό από το λογισμικό SERION *evaluate*.

Εάν η οπτική πυκνότητα του προτύπου είναι εκτός του εύρους ισχύος, εμφανίζεται το παρακάτω μήνυμα.

„Πρότυπες τιμές εκτός εύρους στις ακόλουθες ομάδες: Ομάδα 1-24.” ή

„Η πρότυπη τιμή διαφέρει περισσότερο από 20 % στις ακόλουθες ομάδες: Ομάδα 1-24.”

Σε αυτές τις περιπτώσεις ο κύκλος δοκιμασίας είναι άκυρος και πρέπει να επαναληφθεί.

Οι παράμετροι και η τιμή αναφοράς πρέπει να μεταβάλλεται μόνο όταν υπάρχει αλλαγή παρτίδας (πίνακας υπολογισμού εμφανίζει παραμέτρους και τιμές αναφοράς). Η σωστή εισαγωγή ειδικών για την παρτίδα στοιχείων μπορεί να ελεγχθεί στη βάση της δραστηριότητας του πρότυπου ορού (σε IU/ml ή U/ml) σύμφωνα με τον πρότυπο ορό. Η υπολογισμένη μέση τιμή των μονάδων πρέπει να αντιστοιχεί στη αξιολόγηση που εμφανίζεται στο ειδικό για την παρτίδα πιστοποιητικό. Υπάρχει αυτόματη διόρθωση των μετρημένων τιμών. Στην πρότυπη εκδοχή εκτύπωσης εμφανίζεται το εξής:

Κωδικός δείγματος τιμή OD IU/ml ή U/ml Υπολογισμός
---

### 8.4 Όρια ποσοτικού προσδιορισμού

Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού καθορίζονται στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας της δοκιμασίας SERION ELISA *classic*. Η γραμμικότητα της αραίωσης εντός του εύρους έχει καταδειχτεί σε περιεκτικές μελέτες υπολογισμού. Σε περίπτωση που ένα δείγμα ασθενή παρουσιάζει αποτέλεσμα δοκιμασίας πάνω από το ανώτερο όριο του ποσοτικού προσδιορισμού, το δείγμα θα πρέπει να εξεταστεί σε υψηλότερη αραίωση. Η με αυτόν τον τρόπο καθορισμένη δραστηριότητα αντισωμάτων πρέπει να πολλαπλασιάζεται με τον πρόσθετο παράγοντα αραίωσης.

### 8.5 Εύρος οριακών τιμών

Το εύρος οριακών τιμών της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM καθορίζονται στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας και εμφανίζουν το εύρος για τα οριακά αποτελέσματα της δοκιμασίας. Οι τιμές οι οποίες προκύπτουν κατά τη δοκιμασία του δείγματος ενός ασθενή, που μειώνονται κάτω από αυτό το όριο εμφανίζουν ένα αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας, τιμές επάνω από το όριο των οριακών τιμών ερμηνεύονται ως θετικές. Σε περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός των ορίων των οριακών τιμών, δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η δοκιμασία θα πρέπει να επαναλαμβάνεται παράλληλα με ένα δείγμα παρακολούθησης, το οποίο λαμβάνεται μία με δύο εβδομάδες αργότερα από τον ασθενή (ζεύγος δείγματος).

## 8.6 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η διάγνωση μίας οξείας λοίμωξης με βρουκέλλα μπορεί να γίνει με την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων IgM, IgG και IgA ή με ένα θετικό αποτέλεσμα IgM μόνο. Εντός δύο έως τεσσάρων μηνών από την επιτυχής θεραπεία θα πρέπει να διαπιστώνονται σημαντικές πτώσεις στις τιμές των τίτλων των IgG, ωστόσο, η πλειοψηφία των ασθενών όμως δεν πρόκειται να επανέλθουν στην αρχική οροαρνητική κατάστασή τους. Οι τίτλοι των αντισωμάτων IgM μειώνονται συνήθως μετά από δύο έως τρεις μήνες, όμως σε μερικές περιπτώσεις παραμένουν σταθεροί ακόμη για αρκετούς μήνες μετά από τη λοίμωξη.

Οι σημαντικότεροι παράμετροι για τη διάγνωση της χρόνιας βρουκέλλωσης είναι οι τίτλοι IgG και IgA. Υψηλές τιμές τίτλων αντισωμάτων IgG και IgA σχετίζονται διαγνωστικά και υποδεικνύουν αρχόμενη ή υπάρχουσα χρόνια λοίμωξη. Έχει ωστόσο αναφερθεί ότι μόνον σε 60% των περιπτώσεων αύξησης των αντισωμάτων IgG υφίσταται και παράλληλη αύξηση των αντισωμάτων IgA. Αντιθέτως, αυξήσεις των τίτλων IgM παρατηρούνται στην χρόνια φάση μόνον σε 33% των ασθενών.

Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ της βρουκέλλας και της εντεροκολιτικής πανώλης 09, *Francisella tularensis* και το δονάκιο της χολέρας. Άρα είναι δυνατό να σημειωθούν θετικές αντιδράσεις μετά από τον εμβολιασμό κατά της χολέρας.

## 8.7 Εύρος αναφοράς υγιών ατόμων

Δοκιμασία τυχαίων ορών αιμοδοτών, που συλλέχθηκαν στη νότια Γερμανία, με δοκιμασίες SERION ELISA classic Brucella IgA IgG και IgM έδωσαν αποτελέσματα στην εξής κατανομή. Από τους 180 ορούς, 179 (99.4 %) ήταν αρνητικοί όταν δοκιμάστηκαν με τη δοκιμασία SERION ELISA classic Brucella IgG και ένα δείγμα (0.6 %) παρήγαγε θετικό αποτέλεσμα. Από 180 ορούς που δοκιμάστηκαν με τη δοκιμασία SERION ELISA classic Brucella IgA, 180 (100 %) ήταν αρνητικοί. Πρόσθετα, τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία 180 ορών στη δοκιμασία SERION ELISA classic Brucella IgM ήταν ως εξής: 178 οροί (98,9 %) δοκιμάστηκαν αρνητικοί, ένας ορός (0,6 %) θετικός και ένα (0,6 %) δείγμα ήταν οριακό. Αυτή η κατανομή υποδεικνύει ένα υπόβαθρο ποσοστού εμφάνισης οροθετικότητας 1 % στο γενικό πληθυσμό.

## 9 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### 9.1 Ευαισθησία και Ειδικότητα

Για να καθοριστούν τα χαρακτηριστικά απόδοσης του SERION ELISA classic IgG, IgM και IgA, χρησιμοποιήθηκαν σε μία μελέτη 108 οροί από υγιείς εθελοντές αιμοδότες, 132 οροί από παιδιά (εσωτερικοί ασθενείς σε παιδιατρική κλινική), 44 οροί ασθενών με άλλες νόσους όπως επίσης και 27 ασθενείς με πιθανή βρουκέλλωση και συγκρίθηκαν με μία εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία ELISA. Τα οριακά αποτελέσματα δε συμπεριλήφθηκαν στους υπολογισμούς της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης.

Χαρακτηριστικά απόδοσης	Ευαισθησία	Εξειδίκευση
SERION ELISA classic Brucella IgA	> 99 %	> 99 %
SERION ELISA classic Brucella IgA	> 99 %	99.3 %
SERION ELISA classic Brucella IgA	91.3 %	> 99 %

## 9.2 Επαναληψιμότητα

Η ακρίβεια εντός της ίδιας σειράς δοκιμασιών διαπιστώθηκε με ορούς διαφορετικής αντίδρασης σε πολλαπλές δοκιμασίες 20 φορές σε έναν κύκλο δοκιμασίας. Η ακρίβεια μεταξύ δοκιμασιών διαπιστώθηκε με ορούς διαφορετικής αντίδρασης σε 10 ανεξάρτητους κύκλους δοκιμασίας.

$$\text{Συντελεστής μεταβολής (CV \%)} = \frac{\text{Πρότυπη απόκλιση}}{\text{Μέση τιμή}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Brucella IgA:

Δείγμα	Μέση τιμή (OD)	Στην ίδια δοκιμασία (CV %)	Μέση τιμή (OD)	Μεταξύ δοκιμασιών (CV %)
ασθενώς θετικά	0,598	12,1	0,758	9,3
θετικά	1,794	7,5	2,266	7,5
ισχυρά θετικά	-	-	3,415	1,2

### SERION ELISA classic Brucella IgG:

Δείγμα	Μέση τιμή (OD)	Στην ίδια δοκιμασία (CV %)	Μέση τιμή (OD)	Μεταξύ δοκιμασιών (CV %)
ασθενώς θετικά	0,595	5,5	0,564	11,3
θετικά	1,239	7,2	1,352	13,3
ισχυρά θετικά	-	-	1,941	6,4

### SERION ELISA classic Brucella IgM:

Δείγμα	Μέση τιμή (OD)	Στην ίδια δοκιμασία (CV %)	Μέση τιμή (OD)	Μεταξύ δοκιμασιών (CV %)
ασθενώς θετικά	0,431	14,5	0,526	8,9
θετικά	1,551	6,6	1,064	7,4
ισχυρά θετικά	-	-	1,983	7,0




## 10 ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

### 10.1 Προειδοποιήσεις/ Προφυλάξεις

Το SERION ELISA *classic* σχεδιάστηκε για τη χρήση από εκπαιδευμένο προσωπικό το οποίο είναι καλά εξοικειωμένο με τις εργαστηριακές πρακτικές.

Όλα τα αντιδραστήρια του kit και τα ανθρώπινα δείγματα θα πρέπει να χειρίζονται με προσοχή, χρησιμοποιώντας τις καθιερωμένες πρακτικές εργαστηριακές μεθόδους.

- Αυτό το kit περιέχει στοιχεία ανθρώπινου αίματος. Αν και όλοι οι οροί ελέγχου και οι οροί cut-off έχουν εξεταστεί και βρέθηκαν αρνητικοί για το αντίσωμα αντι-HIV, αντιγόνο HBs (αντιγόνο επιφάνειας ιός ηπατίτιδας B) και αντίσωμα αντι-HCV, θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικοί.
- Μην πιπετάρετε με το στόμα.
- Μην καπνίζετε, τρώτε ή πίνετε σε περιοχές στις οποίες χειρίζεστε δείγματα οι αντιδραστήρια του kit.
- Φοράτε γάντια μίας χρήσης, προστατευτικά ρούχα και γυαλιά κατά τη διάρκεια χειρισμού των αντιδραστηρίων του kit ή των δειγμάτων. Πλύνετε σχολαστικά τα χέρια σας μετά από το χειρισμό.
- Το υλικό των ασθενών και άλλο δυνητικά μολυσματικό υλικό θα πρέπει να απολυμαίνεται μετά από κάθε κύκλο δοκιμασίας.
- Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να φυλάσσονται με ασφάλεια και να μη μπορούν να τα προσεγγίσουν αναρμόδια άτομα, π.χ. παιδιά.
- Διάλυμα διακοπής  διαβρωτικός (C); προκαλεί όξινο έγκαυμα (R34)

Χρησιμοποιείτε γυαλιά ασφαλείας, γάντια και προστατευτικά ρούχα κατά τη διάρκεια του χειρισμού!

### 10.2 Διάθεση

Παρακαλώ λάβετε υπόψη τις σχετικές νομικές απαιτήσεις!

## 11 ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Araj, G.F., Lulu, A.R., Khateeb, M.I., Saadah, M.A., Shakir, R.A. (1988) ELISA versus routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. *APMIS* 96, 171-6.
- [2] Ariza, J., Pellicer, T., Pallares, R., Foz, A., Gudiol, F. (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 14, 131-40.
- [3] BgVV, RKI (1996) Brucellosen-Erkennung und Behandlung, Merkblatt für Ärzte.
- [4] Brouqui, P., Raoult, D. (2000) Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 177-207.
- [5] Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213-21.
- [6] Gad El-Rab, M. O., Kambal, A. M. (1998) Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. *J. Infect.* 36, 197-201.
- [7] Gazapo, E., Gonzalez Lahoz, J., Subiza, J.L., Baquero, M., Gil, J., de la Concha, E.G. (1989) Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. *J. Infect. Dis.* 159, 219-25.
- [8] Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., Pallares, R., Gudiol, F. (1988) Specific antibodies during relapse of human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 157, 918-24.
- [9] Yagupsky, P. (1999) Detection of Brucellae in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3437-42.



# **Atualizações**

**Favor observar as alterações em comparação com a versão anterior.**

**Versão atual n.º: V 12.11/12-1**

**Versão anterior n.º: V 11.11/05-1**

**Atualização na seção: 5, 7.2.1**

## **SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM**

### **ÍNDICE**

- 1 UTILIZAÇÃO PREVISTA**
- 2 RELEVÂNCIA DIAGNÓSTICA**
- 3 PRINCÍPIO DO ENSAIO SERION ELISA *classic***
- 4 COMPONENTES DO KIT**
- 5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**
- 6 ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES**
- 7 Execução do teste SERION ELISA *classic***
  - 7.1 Instruções gerais
  - 7.2 Preparação e armazenamento das amostras
  - 7.3 Preparação dos reagentes do kit
  - 7.4 Execução do teste – apresentação resumida
  - 7.5 Realização do teste pelo método manual
  - 7.6 Realização do teste pelo método automatizado
  - 7.7 Controle positivo / Controlo da exatidão
- 8 VALIDAÇÃO DO TESTE**
  - 8.1 Quantificação de um ponto de acordo com o método-4PL
  - 8.2 Critérios de validação do teste
  - 8.3 Cálculos SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Limites de quantificação
  - 8.5 Intervalos “borderline”
  - 8.6 Interpretação dos resultados
  - 8.7 Intervalo de referência de indivíduos saudáveis
- 9 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**
  - 9.1 Sensibilidade e especificidade
  - 9.2 Reprodutibilidade
- 10 MEDIDAS DE SEGURANÇA**
  - 10.1 Advertências e medidas de precaução
  - 10.2 Eliminação de resíduos
- 11 LITERATURA**



# SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

## Ensaio imunoenzimático para a determinação de anticorpos humanos para uso em diagnóstico *in vitro*

SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgA	Código n.º: ESR116A
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgG	Código n.º: ESR116G
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgM	Código n.º: ESR116M

### 1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

Os testes SERION ELISA *classic* Brucella IgA, IgG e IgM são imunoenaios quantitativos e qualitativos para a detecção de anticorpos humanos no soro ou no plasma contra os agentes patogénicos humanos *Brucella spp.*. A avaliação de cada classe de imunoglobulinas pode ser utilizada para a determinação do contato com o agente patogénico e do estado patológico.

### 2 RELEVÂNCIA DIAGNÓSTICA

As bactérias *Brucella spp.* são Gram-negativas e imóveis, vivendo como parasitas intracelulares num leque variado de animais de criação. A infecção humana é provocada sobretudo por *Brucella melitensis* (“febre de Malta”), *Brucella abortus* (“doença de Bang”) e *Brucella suis*. O patógeno é transmitido por animais infectados (zoonose), pelos seus excrementos e por alimentos contaminados, sobretudo através de laticínios não pasteurizados.

A doença inicia-se geralmente com sintomas gerais, que progridem para febre moderada à medida que a fase aguda começa, sendo esta caracterizada pelo aumento da febre ao fim do dia, hepatomegalia e esplenomegalia ou edema dos nódulos linfáticos. A febre ondulante com intervalos afebris é característica das infecções por *Brucella melitensis* e *Brucella suis*.

A doença pode sarar espontaneamente ou transitar para um estágio crónico com vários quadros clínicos. Durante a fase crónica podem ser afetados diversos órgãos ou sistemas de órgãos, ossos e articulações. Histologicamente, observam-se nos tecidos infectados granulomas característicos.

A endocardite bacteriana é fatal se não for tratada. Durante a fase tardia da brucelose, podem ocorrer manifestações neurológicas e mesmo psiquiátricas.

No diagnóstico diferencial, há que considerar as seguintes doenças: *typhus abdominalis*, linfoma, tuberculose, tularemia, borreliose, hepatite viral e influenza.

Devido ao quadro clínico variável da brucelose crónica, só é possível efetuar um diagnóstico mediante a detecção direta do agente patogénico ou da detecção da resposta de anticorpos específicos no soro ou no líquido cefalorraquidiano. A detecção direta do agente patogénico em sistemas de cultura pode ser realizada por punção e obtendo-se

sangue, medula óssea, líquido sinovial ou urina, mas as exigências nutritivas específicas da *Borrelia* tornam-na difícil de cultivar e limitada a laboratórios especializados. Podem obter-se resultados mais rápidos utilizando métodos serológicos, como testes de aglutinação ou testes de fixação do complemento. Para distinguir entre brucelose aguda e crónica, o método de escolha é a ELISA, que oferece sensibilidade, especificidade e a possibilidade de diferenciar IgA, IgG e IgM.

### **3 PRINCÍPIO DO ENSAIO SERION ELISA *classic***

O teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) é um imunoensaio, que é especialmente adequado para a determinação de anticorpos no campo das doenças infecciosas. A reação baseia-se na interação específica de anticorpos com os antígenos correspondentes. As cavidades da microplaca do kit SERION ELISA *classic* são revestidas com antígenos específicos do agente patogênico de interesse. Se existirem anticorpos na amostra de soro do paciente, eles são ligados ao antígeno fixo. Um anticorpo secundário, que foi conjugado com a enzima fosfatase alcalina, detecta e liga-se ao complexo imune. O substrato incolor p-nitrofenilfosfato é então convertido no produto corado p-nitrofenol. A intensidade do sinal do produto desta reação é proporcional à concentração do analito na amostra e é medido por fotometria.

#### 4 COMPONENTES DO KIT

Componentes do teste	Unidades / volume
<b>Tiras de microplacas quebráveis, cada uma com oito poços individuais revestidos com antígenos</b> (total de 96 poços) <b>[MTP]</b> , 1 moldura de microplaca. O material de revestimento está inativado.	12 unidades
<b>Soro padrão (pronto para uso) <b>[STD]</b>,</b> Soro humano diluído em solução proteica tamponada; negativo para Ac anti-HIV, Ag HBs (antígeno de superfície do vírus da hepatite B) e Ac anti-HCV; conservante: azida de sódio a < 0,1 %; corante: amaranto O.	2 x 2 ml
<b>Soro de controle negativo (pronto para uso) <b>[NEG]</b>,</b> Soro humano diluído em solução proteica tamponada; negativo para Ac anti-HIV, Ag HBs (antígeno de superfície do vírus da hepatite B) e Ac anti-HCV; conservante: azida de sódio a < 0,1 %; corante: verde lissamina V.	2 ml
<b>Conjugado anti-IgA, IgG ou IgM humano (pronto para uso) <b>[APC]</b>,</b> Anticorpo policlonal dirigido contra IgA, IgG ou IgM humanos, conjugado com fosfatase alcalina, estabilizado em solução proteica; conservante: metilisotiazolona a 0,01 %, bromonitrodioxano a 0,01 %.	13 ml
<b>Concentrado de solução de lavagem (suficiente para 1000 ml) <b>[WASH]</b>,</b> Solução de cloreto de sódio com Tween 20 e 30 mM Tris/HCl, pH 7,4; conservante: azida de sódio a < 0,1 %.	33,3 ml
<b>Tampão de diluição <b>[DILB]</b>,</b> Tampão de fosfato contendo proteína e Tween 20; conservante: azida de sódio a < 0,1 %; corante: azul de bromofenol 0,01 g/l.	2 x 50 ml
<b>Solução de parada <b>[STOP]</b>,</b> 1,2 N hidróxido de sódio.	15 ml
<b>Substrato (pronto para uso) <b>[pNPP]</b>,</b> Para-nitrofenilfosfato em tampão isento de solventes; conservante: azida de sódio a < 0,1 % (No frasco ainda fechado o substrato pode apresentar uma coloração ligeiramente amarelada. Isto não compromete a qualidade do produto!)	13 ml
<b>Certificado de controle de qualidade com curva padrão e tabela de valores <b>[INFO]</b></b> (quantificação dos anticorpos em UI/ml ou U/ml).	2 páginas

## 5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- equipamentos comuns de laboratório
- para a detecção de IgM: absorvente Fr SERION, código n.º Z200 (20 ml)
- Leitor de ELISA fotométrico para microplacas com filtro, comprimento de onda 405 nm, comprimento de onda de referência recomendado na gama de 620 nm a 690 nm (p. ex. 650 nm)
- incubadora 37 °C
- câmara húmida
- água destilada
- cliques de pressão (código n.º VT120)



## 6 ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

Reagente	Armazenamento	Validade
Tiras de microtitulação (revestidas com antígeno)	Fechadas  Após a abertura, entre 2 e 8 °C no saco de alumínio fechada, junto com o dessecante  <i>As tiras não utilizadas devem ser armazenadas secas no saco de alumínio hermeticamente fechado.</i>	ver o prazo de validade;  prazo de validade ou 4 semanas;  no caso de utilização e conservação corretas: até expirar o prazo de validade
Soros de controle / soros padrão	Após a abertura: entre 2 e 8 °C	ver o prazo de validade;  24 meses a partir da data de fabricação
Conjugados	Solução pronta para uso: entre 2 e 8 °C <i>Evitar contaminação – p. ex., utilizando somente pontas de pipetas esterilizadas</i>	ver o prazo de validade;  28 meses a partir da data de fabricação
Tampão de diluição	Fechado  Após a abertura: entre 2 e 8 °C  <i>Rejeitar as soluções turvas.</i>	ver o prazo de validade;  36 meses a partir da data de fabricação  24 meses
Solução de lavagem	Concentrado após a abertura: entre 2 e 8 °C Diluição de utilização entre 2 e 8 °C Diluição de utilização à temperatura ambiente <i>Limpar regularmente os recipientes utilizados para a diluição de utilização. Rejeitar as soluções turvas.</i>	ver o prazo de validade;  2 semanas;  1 semana
Substrato	Solução pronta para uso: entre 2 e 8 °C, armazenada protegida da luz <i>Evitar contaminação – p. ex., utilizando somente pontas de pipetas esterilizadas</i> <i>Rejeitar no caso de coloração amarela mais intensa (extinção contra água destilada &gt; 0,25 DO).</i>	ver o prazo de validade;  36 meses a partir da data de fabricação
Solução de parada	Após a abertura, à temperatura ambiente	ver o prazo de validade

## 7 Execução do teste SERION ELISA *classic*

### 7.1 Instruções gerais

Utilizar exclusivamente os reagentes SERION ELISA *classic*, uma vez que estão otimizados para o sistema, e não os substituir por reagentes de outros fabricantes. Os soros padrão e os soros de controle dos imunoenaios SERION ELISA *classic* estão ajustados para o lote específico dos testes dos kits e não podem ser utilizados em outros lotes. O tampão de diluição, a solução de lavagem, o substrato e a solução de parada poderão ser utilizados em todos os testes SERION ELISA *classic*, independentemente do lote e do kit.

Para cada classe de imunoglobulina existem três concentrações diferentes de conjugado: BAIXA, MÉDIA, ALTA. A classificação consta em cada etiqueta, conforme descrito a seguir:

p. ex.: IgG +	conjugado IgG de baixa concentração
IgG ++	conjugado IgG de média concentração
IgG +++	conjugado IgG de alta concentração

Em raros casos faz-se necessário o emprego de conjugados especiais, a fim de assegurar a qualidade dos nossos produtos. Os conjugados especiais são produzidos em lotes separados e não apresentam o sinal "+". Sendo assim, não podem ser substituídos por outros conjugados.

Observar com atenção os avisos registados nas etiquetas!

Em estado fechado, todos os componentes dos testes SERION ELISA *classic* poderão ser utilizados até o seu limite de validade (vide as indicações da etiqueta), desde que sejam armazenados corretamente. Os reagentes não devem ser utilizados após a data de validade.

Qualquer alteração ou a diluição incorreta dos reagentes poderá causar uma perda da sensibilidade.

Os reagentes do teste deverão ser protegidos contra a luz forte durante o armazenamento e a incubação. Após a utilização devem ser bem fechados, a fim de evitar que sequem ou sejam contaminados.

O saco de alumínio para a microplaca somente deve ser cortado nos lugares previstos do lado marcado, para que possa ser fechado novamente. Em caso de danificação do saco de alumínio ou de fechamento incompleto do mesmo, as tiras não utilizadas não devem mais ser empregadas para testes.

Para evitar a contaminação, empregar sempre técnicas assépticas para extrair as alíquotas de reagentes. Para evitar falsos resultados positivos, a ponta da pipeta nunca deverá tocar, nem molhar, a borda superior dos poços durante a pipetagem do conjugado. Tome cuidado para não trocar as tampas dos frascos.

A reprodutibilidade dos resultados depende, dentre outros fatores, da mistura cuidadosa dos reagentes preparados. Antes de utilizar os soros de controle e o conjugado, os recipientes deverão ser bem agitados. As amostras também devem ser bem misturadas após a diluição (p. ex. com um vórtex).

A pipetagem deve ser efetuada cuidadosamente, observando-se os tempos e temperaturas de incubação prescritos. Grandes diferenças de tempo entre a pipetagem do primeiro e do último poço na adição de amostras/soros de controle, conjugado e substrato levam a “tempos de pré-incubação” diferentes, o que poderá influenciar consideravelmente a precisão e a reprodutibilidade dos valores medidos.

Só o cumprimento rigoroso destas instruções garante resultados corretos.

O teste SERION ELISA *classic* só será válido se forem observados os critérios de validação específicos para o lote. Estes critérios estão indicados no certificado de controle de qualidade contido no kit.

Uma lavagem correta evita testes inespecíficos. Por isso, as instruções de utilização dos aparelhos de lavagem deverão ser observadas. Os poços de fundo plano devem ser enchidos uniformemente com solução de lavagem. Ao fim do procedimento, é importante certificar-se de que a solução de lavagem foi completamente removida dos poços, a fim de evitar efeitos de diluição incontroláveis. Evite a formação de espuma!

Durante a lavagem e a aspiração, tome cuidado para não danificar a inscrição (patógeno / classe de anticorpo) das tiras de microtitulação a fim de evitar equívocos.

## 7.2 Preparação e armazenamento das amostras

Amostras lipêmicas, hemolíticas ou ictericas (soro ou plasma) só deverão ser utilizadas sob cuidado específico. Obviamente, amostras contaminadas não devem ser testadas. As amostras de soro ou plasma (EDTA, citrato, heparina) coletadas de acordo com métodos laboratoriais padronizados são consideradas ideais. As amostras não devem ser inativadas termicamente.

### 7.2.1 Diluição das amostras

Antes do início do teste, diluir as amostras dos pacientes ( $V_1$ ) em tampão de diluição ( $V_2$ ) do seguinte modo:

#### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	em	10 $\mu$ l	de amostra do paciente
	por	1000 $\mu$ l	de tampão de diluição

Após cada diluição, e antes da pipetagem na microplaca, as amostras devem ser bem misturadas a fim de se obter uma solução homogênea.

## SERION ELISA *classic* Brucella IgM

### Interferência de fatores reumatóides

Os fatores reumatóides são predominantemente anticorpos da classe IgM, que se ligam de preferência aos imunocomplexos IgG. A presença de anticorpos IgM inespecíficos (fatores reumatóides) pode produzir falsos resultados positivos na prova específica de IgM. Além disso, existe a possibilidade de os anticorpos IgM, de ligação mais fraca, específicos do micróbio patogênico serem suplantados pelos anticorpos IgG, de ligação mais forte. Um despiste IgM pode assim originar um falso resultado negativo. Por esta razão, é necessário submeter as amostras para a determinação de IgM a um tratamento preliminar com absorvente de fator reumatóide (Absorvente SERION de Fator Reumatóide, artigo nº Z200 (20 ml/100 testes)). Para executar a absorção de Fr, a amostra do doente em tampão de diluição Fr é incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C. O procedimento encontra-se descrito num manual de instruções específico.

Antes do ensaio, é necessário efetuar primeiro uma diluição 1+4 do absorvente de fator reumatóide ( $V_1$ ) com tampão de diluição ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	em	200 $\mu$ l	de absorvente-Fr
	por	800 $\mu$ l	de tampão de diluição

As amostras dos pacientes ( $V_4$ ) terão de ser diluídas neste tampão de diluição Fr ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	em	10 $\mu$ l	de amostra do paciente
	por	1000 $\mu$ l	de tampão de diluição Fr

Após cada diluição, e antes da pipetagem na microplaca, as amostras devem ser bem misturadas a fim de se obter uma solução homogênea.

### 7.2.2 Armazenamento das amostras

As amostras dos pacientes não deverão ser armazenadas entre 2 e 8 °C por um período maior que 7 dias. É possível armazenar as amostras durante mais tempo se as mesmas forem armazenadas a um temperatura menor ou igual a -20 °C. Evitar congelamento e descongelamento repetidas vezes. As amostras diluídas poderão ser guardadas entre 2 e 8 °C durante uma semana.

### 7.3 Preparação dos reagentes do kit

Deixar todos os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes de os utilizar.

#### 7.3.1 Tiras da microplaca

As 12 tiras da microplaca estão embaladas em uma moldura juntamente com um agente dessecante num saco de alumínio. Retirar da moldura os poços que não serão utilizados e colocá-los novamente no saco de alumínio com o dessecante, fechando-a hermeticamente.

#### 7.3.2 Soros de controle / soros padrão

Os controles e padrões são prontos para uso e não deverão ser diluídos. Independentemente do número de tiras de microplaca utilizado, em cada teste deverão ser incluídos soros de controle em determinações simples e soros padrão em determinações duplas (duplicata).

Não tratar os soros de controle com absorvente de Fr.

#### 7.3.3 Conjugado AP anti-IgA, IgG ou IgM humanos (pronto para uso)

Os conjugados com a mesma concentração e a mesma classe de imunoglobulina são permutáveis. Evitar a contaminação de conjugados prontos para uso – p. ex., utilizando pontas de pipetas esterilizadas.

#### 7.3.4 Solução de lavagem

Diluir o concentrado de solução de lavagem ( $V_1$ ) 1:30 com água destilada a um volume final ( $V_2$ ).

Exemplo:

Concentrado de solução de lavagem ( $V_1$ )	Volume final ( $V_2$ )
33,3 ml	1000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Tampão de diluição para amostras (pronto para uso)

#### 7.3.6 Substrato (pronto para uso)

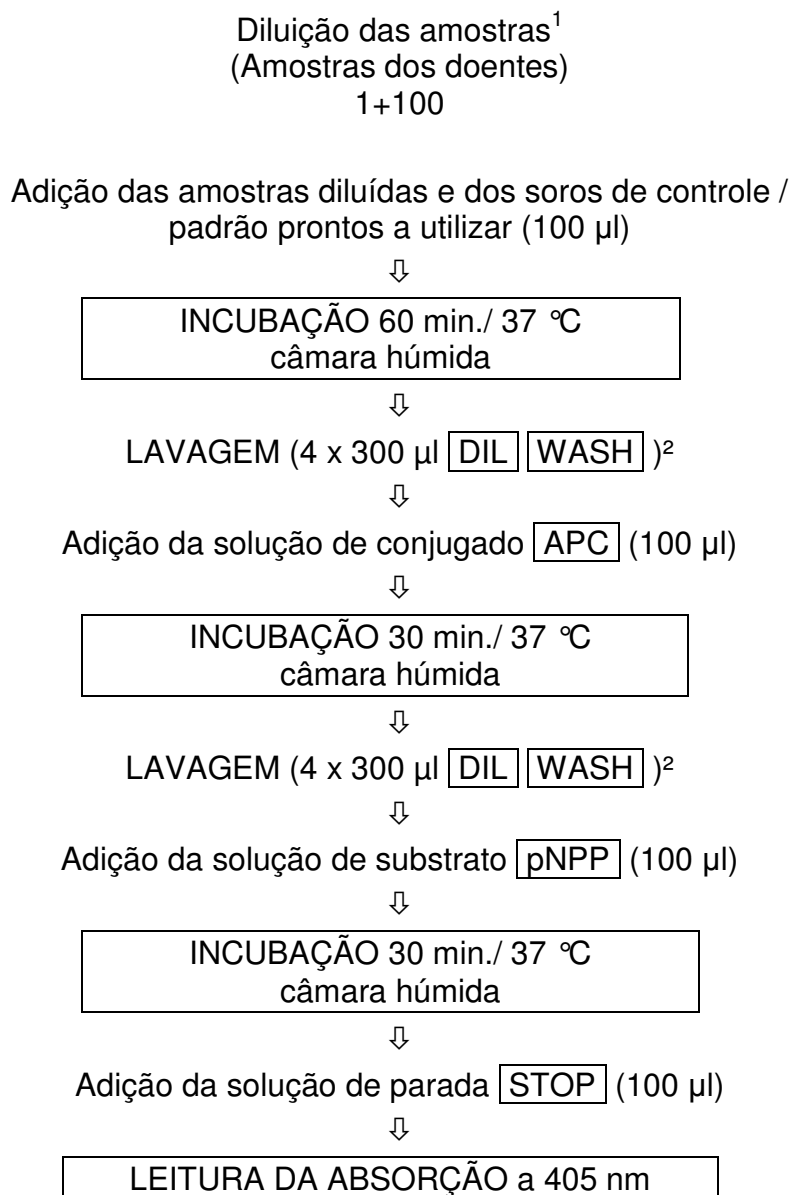
Evitar a contaminação da solução pronta para uso do substrato – p. ex., utilizando pontas de pipetas esterilizadas.

#### 7.3.7 Solução de parada (pronto para uso)

## 7.4 Execução do teste – apresentação resumida

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM quantitativo

No caso de detecção de IgM com absorção de fator reumatóide, ver N.º 7.2.1;  
Incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C



<sup>1</sup>Tampões de diluição especiais para os seguintes testes SERION ELISA *classic*:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Parvovírus B19 IgM e Hantavírus Puumala IgG, IgM

<sup>2</sup> Para lavagem manual: no fim do procedimento, bata suavemente a placa em toalhas de papel.

## 7.5 Realização do teste pelo método manual

1. Colocar o número necessário de **poços na moldura da microplaca** e preparar a folha de protocolo.
2. Adicionar **100 µl de cada uma das amostras diluídas, ou dos controles prontos para uso**, nos respectivos poços das tiras da microplaca. Deixe um poço livre para o Branco do substrato, p. ex.:

IgA/IgG/IgM quantitativo	
poço n.º	
poço A1	branco do substrato
poço B2	controle negativo
poço C1	soro padrão
poço D1	soro padrão
poço E1	paciente - 1....

3. **Incubação das amostras** durante 60 minutos (+/- 5 min.) a 37°C (+/- 1°C) em câmara húmida.
4. No fim do tempo de incubação, **lavar** todos os poços (com equipamento automatizado ou manual):
  - Aspirar ou esvaziar o líquido de incubação dos poços
  - Encher cada poço com 300 µl de solução de lavagem
  - Aspirar ou esvaziar a solução de lavagem
  - Repetir o processo mais 3 vezes (isto é, lavar 4 vezes no total)
  - Esvaziar a placa, batendo-a sobre toalhas de papel
5. **Adição do conjugado**  
Adicionar 100 µl do conjugado IgA/IgG/IgM pronto para uso nos respectivos poços (exceto branco do substrato)
6. **Incubação do conjugado** durante 30 minutos (+/- 1 min.)\* a 37°C (+/- 1 °C) em câmara húmida.
7. No fim do tempo de incubação, **lavar** todos os poços (como descrito acima)
8. **Adição do substrato**  
Adicionar 100 µl do substrato pronto para uso em cada um dos poços (também no do branco do substrato)
9. **Incubação do conjugado** durante 30 minutos (+/- 1 min.)\* a 37°C (+/- 1 °C) em câmara húmida.
10. **Parada da reação**  
Adicionar 100 µl da solução de parada em cada um dos poços e agitar levemente a microplaca para misturar a solução.
11. **Leitura da absorção**  
Dentro de 60 minutos, determinar a densidade ótica (DO) a 405 nm contra o branco do substrato; comprimento de onda de referência entre 620 nm e 690 nm (p. ex. 650 nm).

\* Leve em consideração que, sob condições de trabalho especiais, poderá ser necessário ajustar os tempos de incubação internos do laboratório.

## 7.6 Realização do teste pelo método automatizado

Os testes SERION ELISA são adequados para o processamento automatizado, tendo sido validados com os equipamentos Immunomat™, DYNEX DSX® e DYNEX DS2®. O processamento automatizado é realizado de maneira análoga ao método manual. Leve em consideração que, sob condições de trabalho especiais, poderá ser necessário ajustar os tempos de incubação internos do laboratório.

## 7.7 Controle positivo / Controlo da exatidão

Para verificação periódica do método do teste, em conformidade com os requisitos dos sistemas internos de gestão de qualidade do laboratório, recomendamos a utilização dos Controles SERION ELISA *controls* para determinar a precisão e a confiabilidade dos testes realizados com os kits SERION ELISA *classic*. A utilização dos Controles SERION ELISA *controls* encontra-se descrita em manual de instruções específico.



## 8 VALIDAÇÃO DO TESTE

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Quantificação de um ponto de acordo com o método-4PL

Uma atribuição otimizada dos sinais de absorção para valores quantitativos é garantida pelo uso de funções não-lineares, que ajustam uma curva sigmoide sem qualquer transformação posterior para valores de DO. A determinação da concentração de anticorpos com o kit SERION ELISA *classic* realiza-se de acordo com o modelo “4-parameter logistic-log” (4PL), cuja função matemática é descrita pela fórmula seguinte:

$$DO = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \text{em conc.})}}$$

Os parâmetros A, B, C e D representam exatamente o perfil da curva e definem:

- |                               |               |
|-------------------------------|---------------|
| 1. assíntota inferior         | ⇒ parâmetro A |
| 2. subida da curva            | ⇒ parâmetro B |
| 3. ponto de inflexão da curva | ⇒ parâmetro C |
| 4. assíntota superior         | ⇒ parâmetro D |

O Instituto Virion\Serion GmbH (Würzburg, Alemanha) averigua as curvas padrão para cada lote do kit em testes repetidos, realizados sob ótimas condições. Desta forma, os laboratórios poupam os elevados custos e tempo dispendidos na construção da curva padrão.

Para avaliar as concentrações de anticorpos, em cada embalagem do kit SERION ELISA *classic* é fornecida uma curva padrão e uma tabela de valores específicos para o lote. O software de avaliação SERION *evaluate* e a ferramenta para Microsoft® Excel SERION *avidity* estão disponíveis sob solicitação.

Para compensar variações normais de testes, e para poder verificar a qualidade dos testes realizados, utiliza-se o soro padrão a cada teste. No controle de qualidade do fabricante, são atribuídos a este soro de controle um *valor de referência* e um *intervalo de validade*. Dentro deste intervalo, a quantificação da concentração de anticorpos é segura e confiável.

## 8.2 Critérios de validação do teste

- O branco de substrato deverá ter um valor DO < 0.25.
- O controle negativo deverá produzir um resultado de teste negativo.
- Nos testes quantitativos SERION ELISA *classic*, o valor DO médio do soro padrão (após a dedução do branco de substrato) deverá encontrar-se dentro do intervalo de validade indicado no certificado de controle de qualidade específico para o lote.
- A variação dos valores DO do soro padrão não deverá ser maior que 20 %.

Se estes critérios não forem satisfeitos, o teste será inválido e deverá ser repetido.

## 8.3 Cálculos SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Avaliação não automatizada

Para a avaliação dos testes SERION ELISA *classic*, é fornecido em cada kit um certificado de controle de qualidade, específico para o lote, que contém a curva padrão e uma tabela de valores. Com base nestas, os valores DO obtidos poderão ser atribuídos às atividades de anticorpos correspondentes. O branco de substrato deverá ser descontado de todos os valores DO antes das avaliações.

#### Método 1: Avaliação qualitativa

Para a determinação do intervalo *cut-off*, multiplica-se o valor médio da DO do soro padrão pelos valores numéricos indicados no certificado de controle de qualidade (vide as fórmulas para os sistemas especiais), p. ex.:

DO = 0,502 x valor médio (PADRÃO) no limite superior de *cut-off*

DO = 0,352 x valor médio (PADRÃO) no limite inferior de *cut-off*

Se, por exemplo, o valor médio de absorção do soro padrão for de 0,64, o intervalo *cut-off* será de 0,225 a 0,321.

## Método 2:

Determinação contínua das atividades de anticorpos, por meio da curva padrão

As *variações interensaios* (variações nos testes que ocorrem no dia-a-dia ou de laboratório para laboratório) são compensadas através da multiplicação do valor de medição atual das amostras dos pacientes pelo fator de correção F. Este fator é calculado do seguinte modo:

$$F = \frac{\text{valor DO de referência (do soro padrão)}}{\text{valor DO atual (do soro padrão)}}$$

Este procedimento é necessário para ajustar o nível atual do teste do técnico do laboratório à curva padrão específica do lote. Primeiro as variações diárias deverão ser corrigidas por meio do cálculo do fator F.

1. Calcular o valor médio dos dois valores DO do padrão e verificar se o valor se encontra na gama de validade indicada.
2. Cálculo do fator F: o valor de referência indicado deverá ser dividido pelo valor médio da absorção do soro padrão:  
 $F = \text{valor de referência absorção soro padrão} / \text{valor médio absorção soro padrão}.$
3. Todos os valores de absorção das amostras dos pacientes são multiplicados por F.
4. Com base na curva padrão e nos valores de medição corrigidos, podem ser determinadas as atividades de anticorpos em UI/ml ou U/ml.

### 8.3.2 Validação automática do teste com o software SERION *evaluate*

Depois de introduzidos os quatro parâmetros e o valor de referência do soro padrão, as atividades dos anticorpos são calculadas pelo programa de avaliação SERION *evaluate* após o processamento e a medição dos testes SERION ELISA *classic*.

Se a densidade ótica (DO) do padrão estiver fora do intervalo de validade, a seguinte mensagem será mostrada (em inglês):

„Standard values out of ranges in following groups: Group 1-24.” ou  
„Standard value differ more than 20 % in following groups: Group 1-24.”

Nestes casos, o teste é inválido, devendo ser repetido.

Os parâmetros e o valor de referência só deverão ser mudados em caso de troca do lote (os parâmetros e o valor de referência estão indicados na tabela de valores). É possível verificar se os dados específicos do lote foram introduzidos corretamente com base na atividade (em UI/ml ou U/ml) atribuída ao soro padrão. O valor médio das unidades resultante deverá corresponder ao valor de unidade indicado no certificado específico do lote. Uma correção dos valores de absorção é efetuada automaticamente. Na impressão dos valores de absorção (versão padrão) aparecerá:

Código da amostra: Valor DO UI/ml ou U/ml Avaliação
--

### 8.4 Limites de quantificação

Os limites de quantificação estão especificados no certificado de controle de qualidade do teste SERION ELISA *classic*. A linearidade da diluição dentro deste intervalo foi demonstrada em estudos de avaliação abrangentes. No caso de a amostra do paciente apresentar um resultado acima do limite de quantificação, a amostra poderá ser analisada com uma diluição maior. A atividade de anticorpo determinada deste modo deverá ser multiplicada pelo fator de diluição adicional.

### 8.5 Intervalos “borderline”

Os intervalos “borderline” dos testes SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM estão especificados nos certificados de controle de qualidade e indicam as gamas dos resultados de teste limites. Valores de teste, obtidos de amostras de pacientes, que se situem abaixo deste intervalo indicam resultados negativos; valores que se situem acima deste intervalo são interpretados como positivos. Nos casos em que os resultados se encontrem dentro do intervalo “borderline”, não é possível uma interpretação definitiva. Nestes casos, o teste deve ser repetido paralelamente a uma outra amostra, colhida do paciente uma ou duas semanas depois (par sérico).

## 8.6 Interpretação dos resultados

O diagnóstico de uma infecção aguda por *Brucella* pode ser efetuado mediante a detecção de anticorpos IgM, IgG e IgA específicos ou meramente pela obtenção de um resultado positivo para IgM. No espaço de dois a quatro meses após uma terapêutica bem-sucedida, pode ser evidente uma redução significativa dos títulos de IgG; contudo, na maioria dos doentes, esta não será de dimensões tais que os doentes pareçam ser seronegativos. Os títulos de anticorpos IgM diminuem após dois a três meses, mas, nalguns casos, persistem por vários meses após a infecção.

Os parâmetros mais importantes para o diagnóstico da brucelose crónica são os títulos de IgG e IgA. Títulos de IgG e IgA elevados são relevantes para o diagnóstico e indicam uma infecção crónica inicial ou persistente. Contudo, há registo de que apenas 60 % dos casos apresentam um aumento do título de IgG acompanhado por um aumento simultâneo de IgA. Pelo contrário, só 33 % dos doentes exibem um aumento dos títulos de IgM durante a fase crónica.

Há que considerar a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas entre *Brucella* e *Yersinia enterocolitica* 09, *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae*. É também possível que ocorram reações positivas após a vacinação contra a cólera.

## 8.7 Intervalo de referência de indivíduos saudáveis

A análise de soros de dadores de sangue aleatórios, colhidos na região do sul da Alemanha, com os testes SERION ELISA *classic* Brucella IgA e IgG resultou na distribuição que se segue. Dos 180 soros, 179 (99,4 %) foram negativos quando analisados com o teste SERION ELISA *classic* Brucella IgG e um soro (0,6 %) originou resultados positivos. Dos 180 soros testados com o teste SERION ELISA *classic* Brucella IgA, 180 (100 %) foram negativos. Além disso, os resultados da análise dos 180 soros com o teste SERION ELISA *classic* Brucella IgM foram: 178 soros (98,9 %) foram negativos, 1 soro (0,6 %) reagiu de forma positiva e 1 soro (0,6 %) apresentou valores-limite. Esta distribuição indica uma taxa de seroprevalência de fundo de 1 % na população em geral.

## 9 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### 9.1 Sensibilidade e especificidade

Para determinar as características de desempenho do teste SERION ELISA *classic* IgG, IgM e IgA, foi realizado um estudo que utilizou soros de 108 dadores de sangue saudáveis e 132 soros de crianças (internadas num hospital pediátrico), 44 soros de doentes internados com outras doenças, assim como de 27 doentes com suspeita de brucelose; estes foram testados e comparados com um teste ELISA disponível no mercado. Os resultados próximos dos valores-limite não foram incluídos no cálculo da sensibilidade e da especificidade.

Características de desempenho	Sensibilidade	Especificidade
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgA	> 99 %	> 99 %
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgG	> 99 %	99,3 %
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgM	91,3 %	> 99 %

## 9.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade intra-ensaio foi averiguada com soros de reatividade diferente em preparação múltipla (n = 20) dentro de uma preparação do ensaio. Para a determinação da reprodutibilidade interensaio, foram testados soros com reatividades diferentes em 10 preparações realizadas independentemente.

$$\text{Coeficiente de variação (CV \%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Valor médio}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Brucella IgA:

Amostra	Valor médio (OD)	Intra-ensaio (CV %)	Valor médio (OD)	Interensaio (CV %)
positivo fraco	0,598	12,1	0,758	9,3
positivo	1,794	7,5	2,266	7,5
positivo forte	-	-	3,415	1,2

### SERION ELISA classic Brucella IgG:

Amostra	Valor médio (OD)	Intra-ensaio (CV %)	Valor médio (OD)	Interensaio (CV %)
positivo fraco	0,595	5,5	0,564	11,3
positivo	1,239	7,2	1,352	13,3
positivo forte	-	-	1,941	6,4

### SERION ELISA classic Brucella IgM:


Amostra	Valor médio (OD)	Intra-ensaio (CV %)	Valor médio (OD)	Interensaio (CV %)
positivo fraco	0,431	14,5	0,526	8,9
positivo	1,551	6,6	1,064	7,4
positivo forte	-	-	1,983	7,0

## 10 MEDIDAS DE SEGURANÇA

### 10.1 Advertências e medidas de precaução

O SERION ELISA *classic* destina-se a ser utilizado unicamente por pessoal especializado, que domine por completo as técnicas de trabalho.

A manipulação dos reagentes do teste e das amostras dos pacientes devem seguir os princípios das boas práticas de laboratório.

- Este kit contém componentes de soros humanos. Embora todos os soros de controle sejam negativos para Ac anti-HIV, Ag HBs (antígeno de superfície do vírus da hepatite B) e Ac anti-HCV, eles deverão ser considerados potencialmente infecciosos.
- Não pipetar com a boca.
- Nas áreas onde se trabalha com reagentes de teste ou com amostras de pacientes, não deverá ser permitido comer, beber ou fumar.
- Na manipulação de reagentes do teste e de amostras de pacientes, deve-se utilizar jaleco de laboratório, luvas descartáveis e óculos de proteção. A seguir, lavar muito bem as mãos.
- As amostras dos pacientes e todos os materiais potencialmente infecciosos deverão ser descontaminados após a realização do teste.
- Guardar os reagentes fora do alcance de crianças.
- Solução de parada:  corrosiva (C); causa queimaduras ácidas (R34)

Utilizar óculos de proteção, luvas e jaleco de laboratório.

### 10.2 Eliminação de resíduos

Observar as respectivas disposições legais vigentes.

## 11 LITERATURA

- [1] Araj, G.F., Lulu, A.R., Khateeb, M.I., Saadah, M.A., Shakir, R.A. (1988) ELISA versus routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. *APMIS* 96, 171-6.
- [2] Ariza, J., Pellicer, T., Pallares, R., Foz, A., Gudiol, F. (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 14, 131-40.
- [3] BgVV, RKI (1996) Brucellosen-Erkennung und Behandlung, Merkblatt für Ärzte.
- [4] Brouqui, P., Raoult, D. (2000) Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 177-207.
- [5] Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213-21.
- [6] Gad El-Rab, M. O., Kambal, A. M. (1998) Evaluation of a *Brucella* enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. *J. Infect.* 36, 197-201.
- [7] Gazapo, E., Gonzalez Lahoz, J., Subiza, J.L., Baquero, M., Gil, J., de la Concha, E.G. (1989) Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. *J. Infect. Dis.* 159, 219-25.
- [8] Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., Pallares, R., Gudiol, F. (1988) Specific antibodies during relapse of human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 157, 918-24.
- [9] Yagupsky, P. (1999) Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3437-42.





# Aktualizace

Věnujte, prosím, pozornost rozdílům při porovnání s předchozí verzí

**Číslo aktuální verze:** V 12.11/12-1

**Předchozí verze:** V 11.11/05-1

**Aktualizace v odstavci:** 5, 7.2.1

## **SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM**

### **OBSAH**

- 1 POUŽITÍ
- 2 DIAGNOSTICKÁ RELEVANCE
- 3 PRINCIP TESTU SERION ELISA *classic*
- 4 SLOŽENÍ KITU
- 5 POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ PŘEDMĚTEM DODÁVKY
- 6 UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA
- 7 **SERION ELISA *classic* - POSTUP PŘI TESTU**
  - 7.1 Důkaz o zhoršení kvality
  - 7.2 Příprava vzorku a uchovávání
  - 7.3 Příprava reagensů soupravy
  - 7.4 Přehled – pracovní postup
  - 7.5 Postup při ručním zpracování testu:
  - 7.6 Postup při automatickém zpracování testu
  - 7.7 Pozitivní kontrola/kontrola přesnosti
- 8 **HODNOCENÍ TESTU**
  - 8.1 Jednobodová kvantifikace pomocí metody 4PL
  - 8.2 Kritéria validity
  - 8.3 Výpočet SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Meze kvantifikace
  - 8.5 Hraniční rozpětí
  - 8.6 Interpretace výsledků
  - 8.7 Referenční rozsah zdravých jednotlivců
- 9 **CHARAKTERISTIKY VÝSLEDKŮ**
  - 9.1 Citlivost a specifita
  - 9.2 Reprodukovatelnost
- 10 **BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**
  - 10.1 Výstražná upozornění
  - 10.2 Likvidace
- 11 **ODKAZY**



## SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

### Enzymová imunoanalýza ke stanovení humánních protilátek pro použití v diagnostice *in vitro*

SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgA	Kat. č.:	ESR116A
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgG	Kat. č.:	ESR116G
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgM	Kat. č.:	ESR116M

#### 1 POUŽITÍ

Testy SERION ELISA *classic* Brucella IgA, IgG a IgM jsou kvantitativní a kvalitativní imunoanalýzy k detekci humánních protilátek proti humánně patogenní *Brucella ssp.* v séru a plazmě. Hodnocení individuálních imunoglobulinových tříd lze použít ke stanovení kontaktu s patogenem a stádia nemoci.

#### 2 DIAGNOSTICKÁ RELEVANCE

*Brucella ssp.* jsou gramnegativní nepohyblivé bakterie, které žijí jako intracelulární parazité širokého spektra zemědělských zvířat. Humánní infekce je primárně způsobena druhy *Brucella melitensis* („maltská horečka“), *Brucella abortus* („Bangova choroba“), *Brucella suis* a *Brucella canis*. Patogen se přenáší infikovanými zvířaty (zoonóza), jejich výkaly a kontaminovanou stravou, zvláště nepasterizovanými mléčnými výrobky.

Onemocnění začíná všeobecnými příznaky, které se rozvíjejí do středně silné horečky v začátku akutní fáze, což se projevuje horečkou zvyšující se večer, hepatomegalií a splenomegalií, případně oteklými lymfatickými uzlinami. Pro infekce *Brucella melitensis* a *Brucella suis* je charakteristická horečka undulujícího charakteru s afebrilními intervaly.

Je možné spontánní uzdravení nebo přechod do chronického stádia se širokým spektrem příznaků. V chronickém stádiu může být zasaženo více orgánů či orgánových systémů, kostí nebo kloubů. Z histologického pohledu se v infikovaných tkáních objevují charakteristické granulomy.

Bakteriální endokarditida je smrtelná, pokud není léčena. Během pozdního stádia brucelózy se mohou vyskytnout neurologické a dokonce i psychiatrické manifestace.

Pro diferenciální diagnózu je třeba brát v úvahu následující onemocnění: břišní tyfus, lymfom, tuberkulóza, tularémie, borelióza, virová žloutenka, chřipka.

Díky proměnnému klinickému obrazu chronické brucelózy je diagnostika možná pouze po přímém zjištění patogenu nebo detekci specifické protilátkové odezvy v séru nebo mozkomíšním moku. Přímé zjištění patogenu v kulturačních systémech lze provést v punktátu krve, kostní dřeně, synovie nebo moči, ale speciální nutriční nároky *Brucella* to komplikují a omezují na specializované laboratoře. Rychlejší výsledky lze získat pomocí sérologických metod, například aglutinačními testy nebo testy fixace komplementu. Pro rozlišení mezi akutní a chronickou brucelózou se jako metoda první volby používá ELISA, která nabízí citlivost, specifickou a možnost diferenciace mezi IgA, IgG a IgM.

### 3 PRINCIP TESTU SERION ELISA *classic*

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay [enzymová imunosorpční kvantitativní analýza]) je imunologický test, který je zvláště vhodný ke stanovení protilátek v infekční sérologii. Reakce je založena na specifické interakci protilátek s příslušným antigenem. Testovací proužky mikrotitrační destičky SERION ELISA *classic* jsou pokryty specifickými antigeny vyšetřovaného patogenu. Pokud jsou ve vzorku séra pacienta přítomny protilátky, váží se na fixovaný antigen. Sekundární protilátka, která byla konjugována s enzymovou alkalickou fosfatázou, detekuje imunitní komplex a váže se na něj. Poté je bezbarvý substrát p-nitrofenylfosfát přeměněn na barevný produkt p-nitrofenol. Intenzita signálu tohoto reakčního produktu je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku a měří se fotometricky.

#### 4 SLOŽENÍ KITU

Složky testu	Kusy/ objem
<b>Oddělené proužky mikrotitračního testu, každý s osmi oddělitelnými jamkami potaženými antigenem,</b> (společně 96) ) <b>[MTP]</b> , 1 rámeček Materiál pro potažení je inaktivován	12 kusů
<b>Standardní sérum (připravené k použití) [STD]</b> , Lidské sérum ve fosfátovém pufru s proteinem; negativní na protilátky proti HIV, HBs-Ag (povrchový antigen viru hepatitidy B) a proti HCV; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný; zbarvení: amaranth O.	2 x 2 ml
<b>Negativní kontrolní sérum (připravené k použití) [NEG]</b> , Lidské sérum ve fosfátovém pufru s proteinem; negativní na protilátky proti HIV, HBs-Ag (povrchový antigen viru hepatitidy B) a proti HCV; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný; zbarvení: lisaminová zeleň V	2 ml
<b>Protilátkový konjugát proti humánním IgA, IgG nebo IgM (připravený k použití) [APC]</b> , Polyklonální protilátka proti humánním IgA, IgG nebo IgM, Konjugovaná s alkalickou fosfatázou, stabilizovaná roztokem obsahujícím protein; konzervační prostředek: 0,01 % methylisothiazolon, 0,01 % bromnitrodioxan	13 ml
<b>Koncentrát promývacího roztoku (dostačuje pro 1000 ml) [WASH]</b> , Roztok chloridu sodného s Tween 20 a 30 mM Tris/HCL, pH 7,4; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný	33,3 ml
<b>Ředící pufr [DILB]</b> , Fosfátový pufr obsahující protein s Tween 20; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný; zbarvení: 0,01 g/l bromfenolová modř	2 x 50 ml
<b>Zastavovací roztok [STOP]</b> , 1,2 N hydroxid sodný.	15 ml
<b>Substrát (připravený k použití) [pNPP]</b> , Para-nitrofenylfosfát v pufru bez rozpouštědla konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný (Substrát v neotevřené lahvi může mít mírně nažloutlé zbarvení, které nesnižuje kvalitu přípravku!)	13 ml
<b>Osvědčení o kontrole kvality se standardní křivkou a vyhodnocovací tabulkou [INFO]</b> , (kvantifikace protilátek v IU/ml nebo U/ml).	2 stránky

## 5 POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ PŘEDMĚTEM DODÁVKY

- běžné laboratorní vybavení
- pro detekci IgM: SERION Rf-Absorbent (kat. č. Z200 (20 ml))
- spektrofotometr pro mikrotitrační desky s filtrem, vlnová délka 405 nm, doporučená referenční vlnová délka 620 nm - 690 nm (např. 650 nm)
- inkubátor 37 °C;
- zvlhčovací komora
- destilovaná voda
- Uzavírací svorky (kat. č. VT120)

## 6 UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Reagens	Uchovávání	Stabilita
Mikrotitrační proužky (potažené antigenem)	neotevřené  po otevření při 2 - 8 °C v uzavřeném sáčku z hliníkové fólie s desikantem  <i>Proužky, které se nepoužijí, se musí uložit v suchu v uzavřeném sáčku z hliníkové fólie.</i>	viz datum expirace;  minimální trvanlivost: čtyři týdny;  trvanlivost v případě správného používání a skladování do data expirace
Kontrolní séra /standardní séra	po otevření při 2 - 8 °C	viz datum expirace; 24 měsíců ode dne výroby
Konjugát	roztok připravený k použití při 2 - 8 °C <i>Chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.</i>	viz datum expirace; 28 měsíců ode dne výroby
Ředící pufr	Neotevřený  po otevření při 2 - 8 °C  <i>Zakalené roztoky zlikvidujte.</i>	viz datum expirace; 36 měsíců ode dne výroby 24 měsíců
Promývací roztok	Koncentrát po otevření při 2 - 8 °C pracovní ředění při 2 - 8 °C pracovní ředění při pokojové teplotě <i>Láhve použité pro pracovní ředění se musí pravidelně čistit. Zakalené roztoky zlikvidujte.</i>	viz datum expirace; 2 týdny 1 týden
Substrát	roztok připravený k použití při 2 - 8 °C, chraňte před světlem! <i>Chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.</i> <i>Zlikvidujte, pokud roztok zežloutne (extinkce v porovnání s destilovanou vodou). &gt; 0,25 OD).</i>	viz datum expirace;  36 měsíců ode dne výroby
Zastavovací roztok	Po otevření při pokojové teplotě	viz datum expirace

## 7 SERION ELISA *classic* - POSTUP PŘI TESTU

### 7.1 Důkaz o zhoršení kvality

Při používání kvantitativní imunoanalýzy SERION ELISA *classic* používejte pouze reagencie SERION ELISA *classic*. Složky se nesmí vyměnit za reagencie od jiných výrobců. Standardní a kontrolní séra kvantitativních imunoanalýz SERION ELISA *classic* jsou definovány výlučně pro testovací soupravu, která bude použita, a nesmí se použít v jiných šaržích. Ředící pufr, promývací roztok, substrát a zastavovací roztok lze používat se všemi kvantitativními imunoanalýzami SERION ELISA *classic* bez ohledu na šarži a test.

Pro každou třídu imunoglobulinů existují tři odlišné koncentrace konjugátu: NÍZKÁ, STŘEDNÍ, VYSOKÁ. Klasifikace je uvedena na každém označení následovně:

např. IgG +	konjugát IgG nízké koncentrace
IgG ++	konjugát IgG střední koncentrace
IgG +++	konjugát IgG vysoké koncentrace

Ve vzácných případech je nutné použít speciální konjugát, aby byla zaručena konzistentní kvalita našich výrobků. Speciální konjugáty se vyrábí v samostatné šarži, nejsou označeny symbolem „+“ a nejsou zaměnitelné za jiné.

Věnujte, prosím, velkou pozornost informacím na štítcích!

Pokud zůstanou neotevřené, mohou být všechny složky testů SERION ELISA *classic* používány až do doby uvedené na štítcích, jestliže jsou správně skladovány. Reagencie nepoužívejte po uplynutí data expirace.

Ředění či pozměňování reagiencí může způsobit ztrátu citlivosti.

Během skladování a inkubace chraňte reagencie před silným světlem. Reagencie musí být po použití pevně uzavřeny, aby se zabránilo odpařování a kontaminaci.

Sáček z hliníkové fólie mikrotitrační destičky otevřete tak, že oddělíte pouze horní část vyznačené strany, aby bylo zaručeno, že jej bude možné znovu správně uzavřít. Proužky nepoužívejte, bude-li hliníkový sáček poškozen nebo nebude-li sáček obsahující zbývající proužky a desikant řádně znovu uzavřen.

Přemístění alikvotních množství ze zkumavek s reagenciemi provádějte aseptickými postupy, aby se zabránilo kontaminaci. Aby nedošlo k falešně pozitivním výsledkům, dbejte na to, aby při pipetování konjugátu nedošlo ke kontaktu s horní částí stěn jamek ani k jejich zkrápění. Dávejte pozor na to, aby se nepomíchaly láhve nebo ampulky.

Reprodukovatelnost výsledků testu je závislá na důkladném promíchání reagiencí. Před použitím důkladně protřepejte lahvičky obsahující kontrolní séra a stejně tak postupujte u všech vzorků po naředění (např. pomocí vortexu).



Dbejte na pečlivé pipetování a dodržování stanovených inkubačních časů a teplot. Významné časové rozdíly mezi pipetováním do první a poslední jamky mikrotitrační desky při dávkování vzorků/kontrolních sér, konjugátu či substrátu, mohou vést k různým „předinkubačním“ dobám, které mohou ovlivnit přesnost a reprodukovatelnost výsledků.

Optimálních výsledků lze dosáhnout pouze v případě, že budete pokyny přesně dodržovat.

Kvantitativní imunoanalýza SERION ELISA *classic* je platná pouze v případě, že budou splněna hodnotící kritéria specifická pro danou šarži, uvedená na osvědčení o kontrole kvality.

Adekvátní promývání zabraňuje nespecifickým výsledkům testů. Proto je zapotřebí při promývání postupovat pečlivě. Všechny jamky s plochým dnem se musí naplnit stejným objemem promývacího pufru. Na konci promývání dbejte na to, aby byl z jamek odstraněn veškerý promývací pufr, a aby nedošlo k efektům nekontrolovaného ředění. Zabraňte vzniku pěny!

Dbejte na to, abyste nepoškodili popis (patogen/třída protilátek) na prouzcích mikrotitračních testů během promývání a odsávání, jinak by mohlo dojít k záměně.

## 7.2 Příprava vzorku a uchovávání

Lipemické, hemolytické nebo ikterické vzorky (sérum nebo plazma) by se měly testovat velmi opatrně. Očividně kontaminované vzorky by se testovat neměly. Mezi vhodné vzorky patří sérum nebo plazma (EDTA, citrát, heparin) odebrané podle standardních laboratorních postupů. Vzorky se nesmí tepelně inaktivovat.

### 7.2.1 Ředění vzorků

Před prováděním testu se musí vzorky od pacienta naředit ředícím pufrům ( $V_2$ ) následujícím způsobem:

#### SERION ELISA *classic* Brucella IgG/IgA

$V_1 + V_2 = 1 + 100$	přidejte	10 $\mu$ l	vzorku od pacienta
	k	1000 $\mu$ l	ředícího pufru

Po naředění a před pipetováním na mikrotitrační destičku se vzorky musí důkladně promíchat, aby vznikl homogenní roztok.

## SERION ELISA *classic* Brucella IgM

### Interference revmatoidního faktoru

Revmatoidní faktory jsou autoprotilátky převážně třídy IgM, které se přednostně vážou na imunitní komplexy IgG. Přítomnost nespecifických protilátek IgM (revmatoidních faktorů) může vést k falešně pozitivním výsledkům v imunoanalýze IgM. Navíc je možné, že slabě se vážící, patogen specifické IgM protilátky jsou vytěsněny IgG protilátkami se silnější vazbou, což vede k falešně negativním výsledkům pro IgM. Proto je nezbytné vzorky před detekcí IgM předem upravit absorbentem revmatoidního faktoru (SERION RF-Absorben, kat. č.: Z200 (20 ml/100 testů)). Absorpce Rf se provádí inkubací vzorku pacienta buď v ředícím pufru Rf po dobu 15 minut při pokojové teplotě, nebo přes noc při 4 °C. Postup testu je popsán v samostatném návodu k použití.

Před prováděním testu musí být absorbent revmatoidního faktoru ( $V_1$ ) naředěn 4 díly ředícího pufru ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	přidejte	200 $\mu$ l	Rf-absorbentu
	k	800 $\mu$ l	ředícího pufru

Vzorky od pacienta ( $V_4$ ) musí být naředěny tímto Rf ředícím pufrům ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1 + 100$	přidejte	10 $\mu$ l	vzorku od pacienta
	k	1000 $\mu$ l	Rf ředícího pufru

Po naředění a před pipetováním na mikrotitrační destičku se vzorky musí důkladně promíchat, aby vznikl homogenní roztok.

### 7.2.2 Uchovávání vzorků

Vzorky od pacienta by se neměly uchovávat déle než 7 dní při teplotě 2 až 8 °C. Při teplotě  $\leq -20$  °C lze dobu uchovávání prodloužit. Chraňte vzorky před opakovaným zmrazováním a rozmrazováním. Naředěné vzorky lze skladovat po dobu jednoho týdne při teplotách od 2 do 8 °C.

### 7.3 Příprava reagensí soupravy

Před prováděním testů nechte všechny reagensie dosáhnout pokojové teploty.

#### 7.3.1 Proužky mikrotitračního testu

Proužky mikrotitračního testu v rámečcích jsou zabaleny s desikantem v sáčku z hliníkové fólie. Z rámečku odstraňte nežádoucí jamky a vložte je zpět do hliníkového sáčku. Pečlivě uzavřete sáček, aby se zajistila vzduchotěsnost.

#### 7.3.2 Kontrolní séra /standardní séra

Kontrolní a standardní séra jsou připravena k použití a nesmí se dále ředit. Do každého provedeného testu - nezávisle na počtu použitých proužků mikrotitračního testu- musí být zahrnuto pozitivní kontrolní a standardní sérum. Standardní séra je třeba připravit dvojmo.

Kontrolní séra nezpracovávejte Rf absorbentem.

#### 7.3.3 Protilátkový konjugát proti humánním IgA, IgG nebo IgM (připravený k použití)

Konjugáty se stejnou koncentrací a v rámci stejné třídy imunoglobulinů jsou zaměnitelné. Konjugáty připravené k použití chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.

#### 7.3.4 Promývací roztok

Naředte koncentrát promývacího pufru ( $V_1$ ) 1:30 destilovanou vodou na konečný objem  $V_2$ .

Příklad:

Koncentrát pufru ( $V_1$ )	Konečný objem ( $V_2$ )
33,3 ml	1000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Ředící pufr pro vzorky (připravený k použití)

#### 7.3.6 Substrát (připravený k použití)

Roztok substrátu připravený k použití chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.

#### 7.3.7 Zastavovací roztok (připravený k použití)

## 7.4 Přehled – pracovní postup

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM kvantitativní

V případě detekční IgM absorpce revmatoidního faktoru viz odstavec 7.2.1;  
Inkubace 15 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při teplotě 4 °C.

ředění vzorku<sup>1</sup>  
(vzorky od pacienta)  
1+100

Pipetujte naředěné vzorky a kontrolní séra připravená k použití /  
standardní séra do mikrotitračních jamek (100 µl)



INKUBACE 60 minut /37 °C  
zvlhčovací komora



PROMÝVÁNÍ (4 x 300 µl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Pipetování roztoku konjugátu [APC] (100 µl)



INKUBACE 30 minut /37 °C  
zvlhčovací komora



PROMÝVÁNÍ (4 x 300 µl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Pipetování roztoku substrátu [pNPP] (100 µl)



INKUBACE 30 minut /37 °C  
zvlhčovací komora



Pipetování zastavovacího roztoku [STOP] (100 µl)



ODEČTENÍ EXTINKCE při 405 nm

<sup>1</sup> Speciální ředící puřy pro následující testy SERION ELISA *classic*:  
IgG, IgM *Borrelia burgdorferi*, EBV EA IgG, IgM Parvovirus B19 a IgG, IgM Hantavirus Puumala

<sup>2</sup> Pro ruční použití:  
na konci promývacího procesu vyklepněte destičku na papírový ručník.

## 7.5 Postup při ručním zpracování testu:

1. Umístěte do rámečku **požadovaný počet jamek** a připravte si pipetovací protokol.
2. Do příslušných jamek proužků mikrotitračního testu přidejte **100 µl naředěného vzorku a kontrolní séra připravená k použití**. Jednu jamku nechte volnou pro holý substrát (blank), např.:

IgA/IgG/IgM kvantitativní	
Jamka č.:	
Jamka A1	Holý substrát (blank)
Jamka B1	Negativní kontrolní sérum
Jamka C1	Standardní sérum
Jamka D1	Standardní sérum
Jamka E1	Pacient 1

3. **Inkubace vzorku** po dobu 60 minut (+/- 5 minut) při 37 ° C (+/- 1 °C) ve zvlhčovací komoře
4. Po inkubaci **promyjte** všechny jamky promývacím roztokem (automatickou promývačkou nebo manuálně):
  - odsajte nebo vytřepete inkubační roztok
  - naplňte každou jamku 300 µl promývacího roztoku
  - odsajte nebo vytřepete promývací pufr
  - opakujte promývací proces 3krát (dohromady 4krát!)
  - vysušte odkapáním mikrotitrační desky na filtračním papíru
5. **Přidání konjugátu**  
**Přidejte 100 µl** konjugátu IgA/IgG/IgM do příslušných jamek (s výjimkou holého substrátu (blanku))
6. **Inkubace substrátu** po dobu 30 minut (+/-1 minuta) při 37 °C (+/- 1 ° C) ve zvlhčovací komoře.
7. Po inkubaci **promyjte** všechny jamky promývacím roztokem (viz výše)
8. **Přídavek substrátu**  
Přidejte 100 µl roztoku substrátu připraveného k použití do každé jamky (včetně jamky pro holý substrát (blank)!)
9. **Inkubace substrátu** po dobu 30 minut (+/-1 minuta) při 37 °C (+/- 1 °C) ve zvlhčovací komoře.
10. **Zastavení reakce**  
Přidejte 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky, jemně třepejte mikrotitrační destičkou pro lepší promíchání.
11. **Odečtení extinkce**  
Odečtěte optickou denzitu (OD) během 60 minut při vlnové délce 405 nm proti holému substrátu (blanku), referenční vlnová délka 620 nm a 690 nm( např. 650 nm).

\* Prosím, nezapomeňte, že za zvláštních pracovních podmínek může být v laboratoři nezbytná vnitřní úprava inkubační doby.

## 7.6 Postup při automatickém zpracování testu

SERION ELISA je vhodná pro zpracování na automatech, vyhodnocení použití pomocí přístroje Immunomat™ i DYNEX DSX® a DS2®. Automatické zpracování se provádí analogicky jako při manuálním použití. Prosím, nezapomeňte, že za zvláštních pracovních podmínek může být v laboratoři nezbytná vnitřní úprava inkubační doby.

## 7.7 Pozitivní kontrola/kontrola přesnosti

Pro stanovení přesnosti a spolehlivosti průběhu testů SERION ELISA *classic* a periodické ověření testovací metody doporučujeme používat SERION ELISA *controls*, aby byly splněny požadavky vnitřních systémů řízení kvality laboratoře. Používání SERION ELISA *controls* je popsáno v příslušných návodech k použití.

## 8 HODNOCENÍ TESTU

### SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Jednobodová kvantifikace pomocí metody 4PL

Optimalizované přiřazení extinkčních signálů kvantitativním hodnotám je zaručeno použitím nelineárních funkcí, které upravují esovitou křivku bez jakékoliv další transformace hodnot OD. Určení koncentrací protilátek pomocí metody SERION ELISA *classic* se provádí logisticko-logaritmickým modelem (4 PL, čtyřparametrová), která je ideální pro přesné stanovení křivky. Je založena na vzorci:

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{koncentrace})}}$$

Parametry A, B, C a D jsou pro přesný tvar křivky vypovídající:

- |                    |              |
|--------------------|--------------|
| 1. dolní asymptota | ⇒ parametr A |
| 2. Sklon křivky    | ⇒ parametr B |
| 3. bod zlomu       | ⇒ parametr C |
| 4. horní asymptota | ⇒ parametr D |

U každé šarže se vyhodnocuje standardní křivka v Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg, Německo) pomocí opakovaných testů za optimálních podmínek. Není tedy nutné, aby uživatel prováděl časově náročnou a nákladnou konstrukci standardní křivky.

Každá testovací souprava SERION ELISA *classic* obsahuje specifickou standardní křivku pro hodnocení koncentrací protilátek a specifickou hodnotící tabulku pro danou šarži. Na požádání je k dispozici hodnotící software SERION *evaluate* společně se softwarovým nástrojem SERION *activity*, který je založen na programu Microsoft® Excel.

Při každém individuálním testu se používá standardní sérum pro kompenzaci běžných odchylek testu a rovněž pro kontrolu průběhu testu. Pro toto kontrolní sérum stanoví kontrola kvality výrobce referenční hodnotu s rozmezím validity. V tomto rozmezí je zajištěna správná kvantifikace koncentrace protilátek.

## 8.2 Kritéria validity

- OD holého substrátu (blanku) musí být  $< 0,25$
- Negativní kontrola musí dát negativní výsledek testu.
- Při použití kvantitativních testů SERION ELISA *classic* musí být průměrná hodnota OD standardního séra (po odečtení holého substrátu (blanku)!) v rozmezí validity , které je určeno konkrétním osvědčením kontroly kvality pro danou šarži
- Odchylka hodnot OD standardního séra nesmí být vyšší než 20 %.

Pokud tato kritéria nebudou splněna, test není platný a musí být opakován.

## 8.3 Výpočet SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Neautomatizované hodnocení

Pro hodnocení testu SERION ELISA *classic* je k testovací soupravě přidáno osvědčení kontroly kvality specifické pro danou šarži se standardní křivkou společně s vyhodnocovací tabulkou, aby bylo možné získaným hodnotám OD přiřadit odpovídající aktivity protilátek. Hodnota holého substrátu (blanku) musí být před vyhodnocováním odečtena od všech hodnot OD.

#### **Metoda 1:** Kvalitativní hodnocení

Pro určení horní a dolní hranice normálních hodnot (cut-off hodnota) vynásobte průměrnou hodnotu naměřené standardní OD číselnými údaji z osvědčení o kontrole kvality (viz speciální případové vzorce), např.:

$OD = 0,502 \times MW(STD)$  horní hranice normálních hodnot

$OD = 0,352 \times MW(STD)$  dolní hranice normálních hodnot

Jestliže je naměřená průměrná hodnota absorpance standardního séra 0,64, rozsah horní a dolní hranice normálních hodnot (cut-off) je 0,225 až 0,321.



## Metoda 2:

Průběžné stanovení aktivit protilátek pomocí standardní křivky.

Takzvané odchylky mezi analýzami (odchylky mezi jednotlivými dny a odchylky mezi laboratořemi) se kompenzují vynásobením aktuálně naměřené hodnoty, získané ze vzorku od pacienta, korekčním faktorem F. Tento faktor se vypočítá následovně:

$$F = \frac{\text{Referenční hodnota OD (standardního séra)}}{\text{Aktuální hodnota OD (standardního séra)}}$$

Je nezbytné upravit aktuální úroveň testu uživatele pomocí standardní křivky specifické pro jednotlivou šarži. Za prvé se musí denní odchylky opravit vypočítáním korekčního faktoru F:

1. Musí se vypočítat průměr dvou hodnot OD standardního séra a zkontrolovat, zda je v daném validačním rozmezí hodnot.
2. Výpočet faktoru F: daná referenční hodnota se vydělí průměrnou extinkcí standardního séra:  
 $F = \text{referenční hodnota extinkce standardního séra} / \text{průměrná hodnota extinkce standardního séra}$
3. Všechny naměřené hodnoty vzorků od pacienta se vynásobí F.
4. Aktivity protilátek v IU/ml nebo U/ml lze určit ze standardní křivky pomocí opravených hodnot.

### 8.3.2 Automatické hodnocení testu pomocí softwaru SERION *evaluate*

Po zadání čtyř parametrů a referenční hodnoty standardního séra, se aktivity protilátek vypočítají online ze zpracovaných a naměřených průběhů testu SERION ELISA *classic* pomocí softwaru SERION *evaluate*.

Jestliže je optická densita standardu mimo rozmezí validity, objeví se následující hlášení: „Standardní hodnoty mimo rozmezí v následujících skupinách: Skupina 1-24.“ nebo „Standardní hodnota se liší o více než 20 % v následujících skupinách: Skupina 1-24.“

V těchto případech je průběh testu neplatný a měl by být opakován.

Parametry a referenční hodnota se musí změnit pouze v případě, že došlo ke změně šarže (vyhodnocovací tabulka ukazuje parametry a referenční hodnoty). Správné zadání údajů specifických pro danou šarži lze zkontrolovat na základě aktivity standardního séra (v IU/ml nebo U/ml) přiřazené standardnímu séru. Vypočítaná průměrná hodnota jednotek musí odpovídat jednotkové hodnotě uvedené na osvědčení specifickém pro danou šarži. U naměřených hodnot se provádí automatická oprava. Ve standardní verzi je na výtisku uvedeno následující:

Kód vzorku Hodnota OD IU/ml nebo U/ml Vyhodnocení
--

### 8.4 Meze kvantifikace

Meze kvantifikace jsou uvedeny na osvědčení kontroly kvality testu SERION ELISA *classic*. Linearita ředění byla v tomto rozsahu prokázána komplexními hodnotícími studii. V případě, že vzorek pacienta dává výsledek testu nad horní mezí kvantifikace, vzorek lze testovat při vyšším ředění. Takto stanovená aktivita protilátek se musí vynásobit faktorem dodatečného ředění.

### 8.5 Hraniční rozpětí

Hraniční rozpětí testu SERION ELISA *classic* Brucella IgA/IgG/IgM jsou stanovena na osvědčení kontroly kvality a indikují rozpětí hraničních výsledků testů. Hodnoty získané při testování vzorku pacienta, které jsou nižší než toto rozpětí, indikují negativní výsledek testu; hodnoty nad hraničním rozpětím jsou vykládána jako pozitivní. V případě, že výsledky budou v rámci hraničního rozpětí, definitivní interpretace výsledků není možná. V takových případech je test třeba opakovat souběžně s následujícím vzorkem odebraným o 1 až 2 týdny později.

## 8.6 Interpretace výsledků

Diagnóza akutní infekce *Brucella* je možná pomocí detekce protilátek IgM, IgG a IgA nebo pozitivním výsledkem detekce samotných IgM. Během dvou až čtyřech měsíců po úspěšné terapii může být zjevná významná redukce titrů IgG, ovšem u většiny pacientů nebude platit to, že se projeví jako séronegativní. Titry protilátek IgM obvykle klesají po 2 až 3 měsících, ovšem v některých případech mohou perzistovat několik měsíců po infekci.

Nejdůležitějšími parametry pro diagnózu chronické brucelózy jsou titry IgG a IgA. Zvýšené titry protilátek IgG a IgA jsou diagnosticky významné a jsou projevem časně nebo persistující chronické infekce. Bylo však zaznamenáno, že pouze v 60 % případů je zvýšení titru IgG doprovázeno souběžným zvýšením IgA. Naproti tomu pouze 33 % pacientů vykazuje zvýšení titrů IgM během chronické fáze.

Musí se však vzít v úvahu zkřížené reakce mezi *Brucella*, *Yersinia enterocolitica* 09, *Francisella tularensis* a *Vibrio cholerae*. Jsou i možné pozitivní reakce po očkování proti choleře.

## 8.7 Referenční rozsah zdravých jedinců

Testování náhodných sér dárců krve shromážděných v oblasti jižního Německa testy SERION ELISA *classic* Brucella IgA IgG a IgM poskytlo následující rozdělení. Z těchto 180 sér v případě testování testem SERION ELISA *classic* Brucella IgG bylo 179 (99,4 %) negativních a jeden vzorek (0,6 %) dal pozitivní výsledek. Ze 180 testovaných sér testem SERION ELISA *classic* Brucella IgA bylo 180 (100 %) negativních. Kromě toho výsledky testování 180 sér v testu SERION ELISA *classic* Brucella IgM byly následující: 178 (98,9 %) testovaných sér bylo negativních, jedno sérum (0,6 %) bylo pozitivní a jedno sérum (0,6 %) bylo hraniční. Toto rozdělení indikuje míru séroprevalence pozadí 1 % v celkové populaci.

## 9 CHARAKTERISTIKY VÝSLEDKŮ

### 9.1 Citlivost a specifita

Pro stanovení charakteristik chování testů SERION ELISA *classic* IgG, IgM a IgA byla provedena studie využívající k testování 108 sér od zdravých dárců krve, 132 sér od dětí (hospitalizovaní pacienti dětské nemocnice), 44 sér od hospitalizovaných pacientů s jinými nemocemi a od 27 pacientů s podezřením na brucelózu, kdy byly výsledky porovnány s komerčně dostupným testem ELISA. Mezní výsledky nebyly zahrnuty do výpočtu citlivosti a specifity.

Charakteristiky výsledků	Citlivost	Specifita
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgA	> 99 %	> 99 %
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgG	> 99 %	99.3 %
SERION ELISA <i>classic</i> Brucella IgM	91.3 %	> 99 %

## 9.2 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost uvnitř stanovení (intra-assay) byla stanovena testováním sér různé reaktivity dvacetkrát v průběhu jednoho testu. Reprodukovatelnost mezi stanoveními (inter-assay) byla stanovena testováním vzorků sér různé reaktivity v 10 nezávislých analýzách.

$$\text{Variační koeficient (CV \%)} = \frac{\text{Směrodatná odchylka}}{\text{Průměrná hodnota OD}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Brucella IgA:

Vzorek	Průměrná hodnota (OD)	Intra-assay (CV %)	Průměrná hodnota (OD)	Inter-assay (CV %)
slabě pozitivní	0,598	12,1	0,758	9,3
pozitivní	1,794	7,5	2,266	7,5
silně pozitivní	-	-	3,415	1,2

### SERION ELISA classic Brucella IgG:

Vzorek	Průměrná hodnota (OD)	Intra-assay (CV %)	Průměrná hodnota (OD)	Inter-assay (CV %)
slabě pozitivní	0,595	5,5	0,564	11,3
pozitivní	1,239	7,2	1,352	13,3
silně pozitivní	-	-	1,941	6,4

### SERION ELISA classic Brucella IgM:


Vzorek	Průměrná hodnota (OD)	Intra-assay (CV %)	Průměrná hodnota (OD)	Inter-assay (CV %)
slabě pozitivní	0,431	14,5	0,526	8,9
pozitivní	1,551	6,6	1,064	7,4
silně pozitivní	-	-	1,983	7,0

## 10 BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

### 10.1 Výstražná upozornění

SERION ELISA *classic* je určena k používání kvalifikovaným personálem, který je obeznámen se správnou laboratorní praxí.

Se všemi reagensii v soupravě a vzorky humánních biologických materiálů se musí pečlivě nakládat s uplatněním zásad zavedené správné laboratorní praxe.

- Tato souprava obsahuje složky lidské krve. Ačkoliv všechna kontrolní séra a séra pro stanovení horní a dolní hranice normálních hodnot (cut-off séra) byla negativní s ohledem na protilátky proti HIV, HBs-Ag (*povrchový antigenu viru hepatitidy B*) a HCV, je zapotřebí je považovat za potenciálně infekční.
- Nepipetujte ústy.
- Nekuřte, nejezte ani nepijte v místech, kde se nakládá se vzorky nebo reagensii v kitu.
- Používejte rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a bezpečnostní brýle při práci s reagensii v kitu nebo se vzorky. Poté si důkladně omyjte ruce.
- Materiál od pacienta a další potenciálně infekční materiál musí být po dokončení testu dekontaminován.
- Reagencie musí být uchovávány na bezpečném místě a chráněny před neoprávněnými osobami, např. dětmi.
- Zastavovací roztok:  žíravý (C), způsobuje poleptání (R34).

Při manipulaci používejte rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a bezpečnostní brýle!

### 10.2 Likvidace

Prosím, dodržujte příslušné zákonné požadavky!

## 11 ODKAZY

- [1] Araj, G.F., Lulu, A.R., Khateeb, M.I., Saadah, M.A., Shakir, R.A. (1988) ELISA versus routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. *APMIS* 96, 171-6.
- [2] Ariza, J., Pellicer, T., Pallares, R., Foz, A., Gudiol, F. (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 14, 131-40.
- [3] BgVV, RKI (1996) Brucellosen-Erkennung und Behandlung, Merkblatt für Ärzte.
- [4] Brouqui, P., Raoult, D. (2000) Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 177-207.
- [5] Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213-21.
- [6] Gad El-Rab, M. O., Kambal, A. M. (1998) Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. *J. Infect.* 36, 197-201.
- [7] Gazapo, E., Gonzalez Lahoz, J., Subiza, J.L., Baquero, M., Gil, J., de la Concha, E.G. (1989) Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. *J. Infect. Dis.* 159, 219-25.
- [8] Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., Pallares, R., Gudiol, F. (1988) Specific antibodies during relapse of human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 157, 918-24.
- [9] Yagupsky, P. (1999) Detection of Brucellae in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3437-42.

**SERION ELISA classic**

(V 11/12-1)

Symbole auf den Etiketten/ symbols on labels/ symboles et étiquettes/ simboli sulle etichette/ символы на этикетках/símbolos sobre las etiquetas/ σύμβολα στις ετικέτες/ símbolos nos rótulos / Symboly na štítcích / symboler på etiketter/ symboler på etiketterna/ Symbole na etykietach/ symboly na označení/ Simboli na oznakah/ symbol på etiketter



Hersteller/ Manufacturer/ Fabricant/ Produttore/Производитель/ Fabricante/ Κατασκευαστής/ Fabricante/ Výrobce/ Fremstiller/ Tillverkare/ Producent/ Výrobca/ Izdelovalec/ Produsent



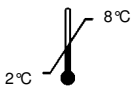
Ausreichend für 96 Tests/ sufficient for 96 tests/ suffisant pour 96 tests/ sufficiente per 96 test/ достаточно для 96 тестов / suficiente para 96 pruebas/ επαρκεί για 96 δοκιμασίες/ suficiente para 96 ensaios/ stačí na 96 testů/ nok til 96 test/ tillräckligt för 96 tester/ Wystarcza na 96 testów/ postačuje na 96 testov/ Zadostuje za 96 testov/ Tilstrekkelig til 96 tester



Charge/ lot/ lot / lotto/ lote/ παρτίδα/ lote/ šarže/ lot/ lot/ seria/ šarža/ serija/ lot /lot



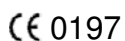
Referenz oder Bestellnummer/ reference or order number/ numéro de référence ou de commande/ numero di riferimento o ordinazione/ ссылка или номер для заказа / referencia o número de pedido/ Αριθμός αναφοράς ή παραγγελίας/ referència ou número para encomenda/ reference nebo číslo objednávky/ reference eller bestillingsnummer/ referens eller beställningsnummer/ Numer referencyjny lub numer zamówienia/ referenčné číslo alebo číslo objednávky/ referenčna ali kataloška številka/ Referanse eller ordrenummer



Lagern zwischen 2 und 8 Grad Celsius/ store between 2 and 8 degree celsius/ entre 2 et 8 degré celsius/ conservare a temperatura compresa tra 2 e 8 gradi centigradi/ хранить при температуре от 2 до 8 градусов цельсия / conservar entre 2 y 8 grados celsius/ Φύλαξη μεταξύ 2 και 8 βαθμούς Κελσίου/ Armazenar entre 2º e 8º Celsius/ uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C/ opbevares mellem 2 og 8 grader celsius/ förvara vid 2 till 8 grader Celsius/ Przechowywać w temp. pomiędzy 2 a 8 stopni Celsjusza/ skladovať pri teplote 2 až 8 stupňov Celzia/ Shranjujte pri temperaturi od 2 do 8 C/ Oppbevares mellom 2 og 8 grader Celsius



CE-Markierung bei Erfüllung der IVD Richtlinie 98/79 EG/ CE marking according to IVD guideline 98/79 EC/ Étiquetage CE selon les directives DIV/ marcatura CE in conformità alla direttiva IVD 98/79 EC/ маркировка CE согласно директивам IVD 98/79 /marca CE según la directiva IVD 98/79 CE/ Σήμανση CE σύμφωνα με την οδηγία IVD 98/79 EE/ Marcação CE de acordo com a Directiva 98/79/ značení CE podle směrnice IVD 98/79/ES/ CE-mærkning iht. IVD-retningslinje 98/79/EF/ CE-mærkning enligt riktlinjerna för IVD i direktiv 98/79/EC/ Oznakowanie CE zgodne z wytycznymi dot. diagnostyki in vitro 98/79 EC/ označenie CE podľa smernice IVD 98/79/ES/ oznaka CE, skladna s smernico IVD 98/79/ES/ CE-merking i henhold til IVD-retningslinjer 98/79/EØF



CE-Markierung bei Erfüllung der IVD Richtlinie 98/79 EG gemäß Anhang II, Liste B/ CE marking according to IVD guideline 98/79 EC according to annex II, list B/ Étiquetage CE selon les directives DIV 98/79 CE selon l'annexe II, liste B/ marcatura CE in conformità alla direttiva IVD 98/79 EC secondo l'allegato II, elenco B/ маркировка CE согласно директивам IVD 98/79, приложение II, список B / marca CE según la directiva IVD 98/79 CE de acuerdo con el anexo II, lista B/ Σήμανση CE σύμφωνα με την οδηγία IVD 98/79 EE, σύμφωνα με το παράρτημα II, κατάλογο B/ Marcação CE de acordo com a Directiva 98/79/ CE relativo aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*, segundo a lista B do anexo II/ značení CE podle směrnice IVD 98/79/ ES podle příloh II, seznamu B/ CE-mærkning iht. IVD-retningslinje 98/79 /EF iflg. annekts II, liste B/ CE-mærkning enligt riktlinjerna för IVD i direktiv 98/79/EC, bilaga II, lista B/ Oznakowanie CE zgodne z wytycznymi dot. diagnostyki in vitro 98/79 EC, zgodnie z aneksem II, lista B/ označenie CE podľa smernice IVD 98/79 ES v znení dodatku II, zoznam B/ oznaka CE, skladna s smernico IVD 98/79/ES in seznamom B v Dodatku II/ CE-merking i henhold til IVD-retningslinjer 98/79/EØF, tillegg II, liste B



Verfallsdatum/ expiry date/ date d'expiration/ data di scadenza/ срок годности до /fecha de caducidad/ ημερομηνία λήξης/ data de validade/ datum exspirace/ udløbsdato/ förfallodatum/ data upływu ważności/ dátum expirácie/ datum izteka roka uporabnosti/ utløpsdatp





Mikrotiterplatte (brechbare Streifen)/ microtiter plate (breakable strips)/ plaque de microtitration (bandelettes détachables)/ piastra per microtitolazione (strisce separabili)/ микротитровальная панель (отрывные стрипы) /placa de microtitulación (tiras rompibles)/ Πλάκα μικροτιτλοποίησης (αποσπώμενες ταινίες)/ placa de microtitulação (tiras quebráveis)/ mikrotitrační deska (rozlomitelné proužky)/ mikrotiterplade (afbrækkelige strimler)/ mikrotiterplatta (brytbara strips)/ Płytką mikrotitracyjną (paski do odrywania)/ mikrotitračná platnička (rozlomitelné prúžky)/ vsebnik za mikrotitriranje (z razdelki, ki jih je mogoče odlomiti)/ Mikrotiterplatte (avbrytbare strips)



Antigen/ antigen/ Antigène/ antigene/ антиген /antígeno/ αντιγόνο/ antigénio/ antigen/ antigen/ antigen/ Antygen/ antigén/ antigen/ Antigen

- AK** Antikörper/ antibodies/ Anticorps/ anticorpi/ антитела / anticuerpos/ αντίσωμα/ anticorpos/ protilátky/ antistoffer/ antikroppar/ Przeciwciała/ protilátky/ protitelesa/ Antistoffer
- CAG** Kontrollantigen/ control antigen/ antigène de contrôle/ antigene di controllo/ контрольный антиген /antígeno de control/ αντιγόνο ελέγχου/ antígeno de controle/ kontrolní antigen/ kontrolantigen/ kontrollantigen/ antygen kontrolny/ kontrolný antigén/ kontrolni antigen/ kontrollantigen
- STD** Standardserum/ standard serum/ SÉRUM standard/ siero standard/ стандартная сыворотка /suero patrón/ πρότυπος ορός/ soro padrão/ standardní sérum/ standardserum/ standardserum/ Surowica standardowa/ štandardné sérum/ standardni serum/ Standardserum
- POS** Positivkontrolle/ positive control/ Contrôle positif/ controllo positivo/ положительные контроли /control positivo/ θετικός έλεγχος/ controlo positivo/ pozitivní kontrola/ positiv kontrol/ positiv kontroll/ Kontrola pozytywna/ pozitivna kontrola/ pozitivna kontrola/ Positiv kontroll
- C/O** Grenzwertiges Serum/ cut-off serum/ SÉRUM seuil/ siero cut-off/ сомнительные сыворотки (пограничные)/suero de corte/ οριακός ορός (cut-off)/ soro *cut-off*/ cut-off sérum/ cutoff-serum/ cutoff-serum/ Surowica „cut-off“/ sérum na určenie hraničnej hodnoty/ mejni serum/ Stopps serum
- NEG** Negativkontrolle/ negative control/ Contrôle négatif/ controllo negativo/ отрицательные контроли /control negativo/ αρνητικός έλεγχος/ controlo negativo/ negativní kontrola/ negativ kontrol/ negativ kontroll/ Kontrola negatywna/ negatívna kontrola/ negativna kontrola/ Negativ kontroll
- APC** Alkalisches Phosphatase Konjugat antihuman/ alkaline phosphatase conjugate anti-human/ conjugué phosphatase alcaline anti-humain/ coniugato con fosfatasi alcalina anti-umano/ античеловеческий щелочной конъюгат фосфатазы / conjugado anti humano de fosfatasa alcalina/ Σύζευξη αλκαλικής φωσφατάσης/ conjugado anti-humano com fosfatase alcalina/ konjugát alkalické fosfatázy anti-humánní/ alkalisk phosphatase konjugat antihumant/ antihumant alkaliskt fosfatas-konjugat/ Antyludzki koniugat fosfatazy alkalicznej/ konjugát antihumánnejalkalickej fosfatázy/ konjugat alkalne fosfataze, antihumani/ Alkalisk fosfatase-konjugat, anti-humant
- +** niedrig-konzentriertes Konjugat/ conjugate with low concentration/ conjugué à faible concentration/ coniugato a concentrazione bassa/ конъюгат низкой концентрации /conjugado con concentraci6n baja/ Σύζευξη χαμηλής συγκέντρωσης/ conjugado de baixa concentraç6o/ konjugát s nízkou koncentrací/ konjugat med lav koncentration/ konjugat med låg koncentration/ koniugat o niskim stężeniu/ konjugát so strednou koncentráciou/ konjugat z majhno koncentracijo/ Konjugat med lav konsentrasjon
- ++** mittel-konzentriertes Konjugat/ conjugate with medium concentration/ conjugué à concentration moyenne/ coniugato a concentrazione media/ конъюгат средней концентрации /conjugado con concentraci6n media/ Σύζευξη μέτριας συγκέντρωσης/ conjugado de concentraç6o intermédia/ konjugát se střední koncentrací/ konjugat med medium koncentration/ konjugat med medelhög koncentration/ koniugat o średnim stężeniu/ konjugát so strednou koncentráciou/ konjugat s srednj6 koncent/ Konjugat med middels konsentrasjon
- +++** hoch-konzentriertes Konjugat/ conjugate with high concentration/ conjugué à concentration élevée/ coniugato a concentrazione alta/ высококонцентрированный конъюгат/ conjugado con concentraci6n alta/ σύζευξη υψηλής συγκέντρωσης/ conjugado de elevada concentraç6o/ konjugát s vysokou koncentrací/ konjugat med høj koncentration/ konjugat med hög koncentration/ koniugat o wysokim stężeniu/ konjugát s vysokou koncentráciou/ konjugat z veliko koncentracijo/ Konjugat med høy konsentrasjon
- RF** Rheumafaktor-Absorbens (Rf-Absorbens)/ rheumatoid factor absorbent (rf-absorbent)/ absorbant de facteur rhumatoïde (rf-absorbant)/ adsorbente del fattore reumatoide (adsorbente Rf)/ абсорбент ревматоидного фактора (Rf-абсорбент) /adsorbente de factor reumatoide (material absorbente de Rf)/ Απορροφητής ρευματοειδούς παράγοντα (απορροφητής Rf)/ absorbente de factor reumatóide (absorbente de Fr)/ absorbent revmatoidního faktoru (rf-absorbent)/ reumafaktor- absorptionsmiddel (rf-absorptionsmiddel)/ reumafaktor-absorptionsmedel (rf-absorptionsmedel)/ Absorbent czynnika reumatoidalnego (absorbent RF)/ absorbent reumatoidného faktora (absorbent rf)/ absorbent revmatoidnega faktorja (absorbent RF)/ Revmatoid faktor-absorbent (rf-absorbent)
- DILB** Verdünnungspuffer für Serum/ dilution buffer for sera/ sérum pour le tampon de dilution/ tampone di diluizione per sieri / разбавляющий буфер для сыворотки / solución amortiguadora para los sueros/ ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης για ορούς/ tampão de diluição para soro/ ředici pufr pro séra/ fortyndingsbuffer til sera/ spädningsbuffert för serum/ bufor rozcieńczający do surowic / pufo na riedenie sér/ pufo za redčenje seruma/ Fortynningsbuffer til serum
- DILBS1**
- DILBS2**
- DILBS3**



- WASH** Waschlösungskonzentrat/ washing solution concentrate/ concentré de solution de lavage / soluzione di lavaggio concentrata / промывочный концентрат /concentrado de solución de lavado/ συμπύκνωμα έκπλυσης/ concentrado de solução de lavagem/ koncentrát promývacího roztoku/ vaskeopløsningskoncentrat/ tvättlösningkoncentrat/ Stężony roztwór do płukania/ koncentrát premývacieho roztoku/ koncentrat za raztopino za izpiranje/ Vaskeløsningskonsentrat
- pNPP** pNPP Substrat/ pNPP substrate/ substrat Pnpp/ substrato pNPP/ pNPP субстрат / sustrato pNPP/ Υπόστρωμα pNPP/ substrato pNPP/ pNPP substrát/ pNPP-substrat/ pNPP-substrat/ Substrat pNPP/ substrát pNPP/ substrat pNPP/ pNPP-substrat
- STOP** Stoppløsning/ stopping solution/ solution d'arrêt/ soluzione di arresto/стоп-раствор/ solución de parada/ διάλυμα διακοπής/ solução de paragem/ zastavovací roztok/ stopopløsning/ stoppløsning/ roztwór zatrzymujący reakcję/ ukončovací roztok/ raztopina za ustavitve reakcije/ stoppeløsning
-  ätzend/ corrosive/ corrosif/ corrosivo/ едкий /corrosivo/ διαβρωτικό/ corrosivo/ žíravý/ ætsende/ frätande/ czynnik korozyjny/ koroziívne/ jedko/ etsende
-  ätzend/ corrosive/ corrosif/ corrosivo/ едкий /corrosivo/ διαβρωτικό/ corrosivo/ žíravý/ ætsende/ frätande/ czynnik korozyjny/ koroziívne/ jedko/ etsende
- INFO** Gebrauchsanweisung, Zertifikat (Standardkurve und Auswertetabelle), CD/ instructions, certificate (standard curve and evaluation table), CD/ instructions, certificat (courbe de référence et tableau d'évaluation), CD/ istruzioni per l'uso, certificato (curva standard e tabella interpretativa), CD/ Инструкция по применению, сертификат (стандартная кривая и таблица для оценки), компактний диск /instrucciones, certificado (curva patrón y tabla de evaluación), CD/ Οδηγίες χρήσης, Πιστοποιητικό (πρότυπη καμπύλη και πίνακας υπολογισμού), CD/ instruções, certificado (curva padrão e tabela de avaliação), CD/ (standardní křivka a vyhodnocovací tabulka), CD/ brugsanvisning, certifikat (standardkurve og evalueringstabel), CD/ instruktioner, certifikat (standardkurva och utvärderingstabel), CD/ Instrukcje, certyfikat (krzywa standardowa i tabela do określania wyników/ CD/ pokyny, certifikát (šstandardná krivka a hodnotiaca tabuľka), disk CD/ navodila, certifikat (standardna krivulja in ocenjevalna tabela), CD/ Instruksjoner, certifikat (standardkurve og evalueringstabel), CD
- RTU** gebrauchsfertig/ ready-to-use/ prêt à l'emploi/ pronto per l'uso/ готовый к использованию /listo para usar/ έτοιμο προς χρήση/ pronto a utilizar/ připravený k použití/ klar til brug/ bruksfærdig/ gotowy do użycia/ pripravené na použitie/ pripravljen za uporabo/ klar til bruk
- CONC** Konzentrat/ concentrate/ concentré/ concentrato/ концентрат / concentrado/ Συμπύκνωμα/ concentrado/ koncentrát/ koncentrat/ koncentrat/ Konzentrat/ koncentrát/ koncentrat/ Konsentrat
- DIL** verdünnen oder lösen in/ dilute or dissolve in/ diluez ou dissoudre dans/ diluire o sciogliere in/ разбавить или растворить в /diluir o disolver en/ αραιώση ή διάλυση σε/ diluir ou dissolver em/ naředte nebo rozpustte v/ fortynd eller opløs i/ späd eller lös i/ Rozcieńczyć lub rozpuścić w/ rozriediť alebo rozpustiť v/ razredčite ali raztopite v/ Fortynnes eller løses opp i
- AQUA** destilliertes Wasser/ aqua detillata/ eau distillée/ acqua distillata/ дистиллированная вода /agua destilada/ αποσταγμένο νερό/ água destilada/ destilovaná voda/ destilleret vand/ destillerat vatten/ woda destylowana/ destilovaná voda/ destilirana voda/ Destillert vann
- IVD** In-vitro Diagnostik Anwendung/ in-vitro diagnostic use/ utilisation en diagnostic in-vitro/ uso diagnostico in vitro/ использование в диагностике ин-витро /uso diagnóstico in-vitro/ Διάγνωση, χρήση in-vitro/ para diagnóstico in vitro/ diagnostické použitie in-vitro/ til in-vitro diagnostik/ in vitro-diagnostisk användning/ do diagnostyki in vitro/ diagnostické použitie in-vitro/ uporaba pri diagnostiki in vitro/ In vitro-diagnostisk bruk

**SERION ELISA classic**

102	Masern Virus / Measles Virus / Rougeole	1262	Parainfluenza Virus 2
103	Mumps Virus / Parotitis virus / Oreillons	1263	Parainfluenza Virus 3
104	Varicella-Zoster Virus (VZV)	127	Mycoplasma pneumoniae
105	Herpes simplex Virus 1/2	128	Adenovirus
1051	Herpes simplex Virus 1	129	Röteln Virus / Rubella virus / virus de rubéole
1052	Herpes simplex Virus 2	130	Diphtherie / Diphtheria
106	Legionella pneumophila 1-7	1311	Coxiella burnetii (Q-Fieber) Phase 1 / Coxiella burnetii (Q-fever) phase 1
107	Echinococcus	1312	Coxiella burnetii (Q-Fieber) Phase 2 / Coxiella burnetii (Q-fever) phase 2
108	Tetanus	132	Aspergillus fumigatus
109	Cytomegalovirus	133	Enterovirus
110	Toxoplasma gondii	134	Coxsackievirus
112	FSME Virus / TBE Virus	135	Echovirus
113	Resp. Syncytial Virus (RSV)	1361	Epstein-Barr Virus VCA
114	Dengue Virus	1362	Epstein-Barr Virus EBNA 1
116	Brucella	1363	Epstein-Barr Virus Early Antigen
117	Candida albicans	137	Chlamydia
118	Helicobacter pylori	1371	Chlamydia pneumoniae
120	Bordetella pertussis	1372	Chlamydia trachomatis
1201	Bordetella pertussis Toxin	138	Yersinia
121	Borrelia burgdorferi	139	Campylobacter jejuni
122	Parvovirus B19	140	Bacillus anthracis
1231	Influenza A Virus	142	Francisella tularensis
1232	Influenza B Virus	143	Tyropoxidase
125	Leptospira	144	Thyroglobulin
126	Parainfluenza Virus 1, 2, 3	145	Hantavirus Puumala
1261	Parainfluenza Virus 1		