



# MASTAZYME BRUCELLA

Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von humanen IgG / IgM / IgA Antikörpern gegen Brucella in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection and quantification of human IgG / IgM / IgA antibodies against Brucella in serum and plasma

Test immunoenzymatique pour la détection et la quantification des anticorps IgG / IgM / IgA anti Brucella dans le sérum et le plasma humain

## Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



**Nur zur *in-vitro* Diagnostik**

**For *in-vitro* diagnostic use only**

**Usage *in vitro* uniquement**



Deutsch:            Seiten 02 - 08



English:            Pages 09 - 15



Français:           Pages 16 - 23

<b>Test</b>	<b>Best.-Nr./ Order Codes/ Code</b>	<b>Kits für/ Kits for/ Conditionnement</b>
MASTAZYME BRUCELLA IgG	680251	12 x 8 Tests
MASTAZYME BRUCELLA IgM	680252	12 x 8 Tests
MASTAZYME BRUCELLA IgA	680253	12 x 8 Tests

**Lagerung / Storage / Conservation: 4 - 8 °C**



	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
1.	Einleitung	3
2.	Testprinzip und Verwendungszweck	3
3.	Packungsinhalt	4
4.	Zusätzlich benötigte Materialien	4
5.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	5
6.	Lagerung und Stabilität	5
7.	Probengewinnung und -handhabung	5
8.	Testdurchführung	6
9.	Auswertung und Interpretation	7
10.	Testcharakteristika	7
11.	Literatur	8



## 1. Einleitung

Brucellose ist der Oberbegriff für epidemiologisch nahe verwandte Erkrankungen bei Mensch und Tier (z. B. Bang Krankheit, Schweinepest), die durch verschiedene Brucella Biotypen verursacht werden.

Brucella sind kleine ellipsoide gramnegative Bakterien, die in vier Arten unterteilt werden, Br. abortus, Br. melitensis, Br. suis und Br. canis.

Neben dem Umgang mit infizierten Tieren sind Lebensmittel-Kontaminationen die häufigste Infektionsquelle.

Beim Menschen wird die Erkrankung als undulierendes Fieber bzw. Bang'sche Krankheit bezeichnet. Bei der Bang-Krankheit handelt es sich um periodisch wiederkehrendes Fieber mit Organ-Manifestation an Milz und Leber. Es können auch Entzündungen auftreten, die andere Organe und Gelenke betreffen. So werden Zusammenhänge zwischen einer Brucellainfektion und einer später auftretenden MS-Erkrankung vermutet.

Zu den gefährdeten Personengruppen zählen Mitarbeiter der Fleischindustrie, Landwirte, Tierärzte, Besitzer von Haustieren sowie Urlauber aus südlichen Ländern.

Die Diagnose kann durch Direktnachweis des Erregers in verschiedenen Specimen (Blut, Liquor, Sputum, etc.) erfolgen. Chronische Verläufe sowie bereits begonnene Antibiotika-Therapie führen oft zu einem negativen Ergebnis.

Alternativ werden serologische Detektionsverfahren wie Agglutination, Komplementbindungsreaktion (KBR) und ELISA eingesetzt. Bei Verwendung eines ELISAs kann zwischen dem Nachweis von IgM-/IgA-Antikörpern, die nur in der akuten Phase nachweisbar sind, und IgG-Antikörpern, die bei einer chronischen Brucellose lange persistieren, unterschieden werden.

## 2. Testprinzip und Verwendungszweck

Der MASTAZYME BRUCELLA Antikörper ELISA dient dem Nachweis und der Quantifizierung von spezifischen IgG-/ IgM-/ IgA-Antikörpern gegen Brucella in Serum oder Plasma. Die Verwendung des ELISAs für andere Körperflüssigkeiten kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden. MASTAZYME BRUCELLA ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

Das Testprinzip des ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

### 2.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit dem Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 60minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

### 2.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschrift

Meerrettich-Peroxidase-markiertes anti-human-IgG /-IgM /-IgA bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

### 2.3 Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 20 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 N Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

### 2.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600 – 690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o.ä.) ermittelt werden.



### 3. Packungsinhalt

Der Testkit enthält genügend Reagenzien für 12 x 8 = 96 Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotiterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 4 - 8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

12	Streifen	je 8 einzeln abbrechbaren Wells, die mit Antigenen von <i>Brucella abortus</i> beschichtet sind
1 x	Rahmen	für Streifen der Mikrotiterplatte (MTP)
4 x 2 mL	Kalibratoren 1 - 4	humanes Serum mit IgG-/ IgM-/ IgA-Antikörpern gegen <i>Brucella</i> , verdünnt mit PBS in folgenden Konzentrationen, stabilisiert mit 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromnitrodioxan als Konservierungsmittel, gebrauchsfertig

		IgG	IgM	IgA
Kal. 1 (negativ)	Konzentration (U/mL)	1	1	1
Kal. 2 (Cut-off)		10	10	10
Kal. 3 (schwach positiv)		40	50	50
Kal. 4 (positiv)		150	200	200

1 x 60 mL	Serumdiluent	PBS/BSA Puffer Natriumazid ( $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ ) als Konservierungsmittel
1 x 12 mL	Enzymkonjugat	Meerrettich-Peroxidase markiertes anti-human-IgG /-IgM /-IgA (Ziege), gebrauchsfertig
1 x 12 mL	TMB-Substrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Stopplösung	0,5 N $\text{H}_2\text{SO}_4$ (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
1 x 60 mL	Waschpuffer 10 x Konzentrat	PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, vor Gebrauch kurz erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen
2 x	Abdeckfolien	Zur Abdeckung der Mikrotiterplatte (MTP) während der Inkubation
1 x	Plastikbeutel	Zur Lagerung nicht benötigter MTP-Streifen

### 4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600 – 690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität



## 5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18 - 24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen verwenden.
- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.
- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Laborgeräte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Waschgeräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

## 6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 4 - 8 °C lagern.

Das Verfallsdatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 4 - 8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden.

## 7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 2 Tage bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren. Proben, deren Konzentration über dem höchsten Kalibrator liegt, müssen mit Serumdiluent weiter verdünnt und erneut analysiert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipemische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.



Vor der Analyse müssen **Patientenproben** mit **Serumdiluent 1:101** (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Serumdiluent) verdünnt werden.

Zur Vermeidung von Störungen durch Rheumafaktoren können die Patientenproben mit MASTSORB (Kat.-Nr.: 651003) präabsorbiert werden. Kalibratoren dürfen **n i c h t** absorbiert werden.

## 8. Testdurchführung

### 8.1. Vorbereitung der Reagenzien

**Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18 - 24 °C) bringen.**

**Waschpuffer:** Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das **Waschpuffer-Konzentrat** mit **destilliertem Wasser 1:10** verdünnen (z. B. 60 mL Konzentrat + 540 mL dest. Wasser), mischen.

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Für die quantitative Auswertung ist mit jedem Testansatz eine Eichkurve zu erstellen.
- Nicht benötigte MTP-Streifen sollten in der Plastikhülle bei 4 - 8 °C trocken gelagert werden.

### 8.2. Testablauf

**Hinweis:** Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je **100 µL** der **vorverdünnten (1:101) Patientenproben** und **gebrauchsfertigen Kalibratoren** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei **RT** für **60 Minuten** inkubieren.
3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit **3 x 300 µL** gebrauchsfertigem **Waschpuffer** waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. **100 µL Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei **RT** für **30 Minuten** inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. **100 µL TMB-Substrat** pipettieren.
8. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei **RT** für **20 Minuten im Dunkeln** inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stopplösung** beenden.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei **450 nm** messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600 - 690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch an Hand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

**Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.**



## 9. Auswertung und Interpretation

### Beispiel

	OD 450 nm	korrigierte OD Werte	Mittelwert OD
Blank	0,020		
Kalibrator 1 (negativ)	0,077 / 0,059	0,057 / 0,039	0,048
Kalibrator 2 (cut-off)	0,537 / 0,501	0,517 / 0,481	0,499
Kalibrator 3 (schwach positiv)	1,069 / 1,103	1,049 / 1,083	1,066
Kalibrator 4 (positiv)	2,041 / 2,069	2,021 / 2,049	2,035

Die obige Tabelle dient als Beispiel. Die Daten beschreiben keine Werte, die in anderen Laboratorien erhalten wurden. Die Daten dürfen **nicht** zur Erstellung einer Eichkurve verwendet werden.

### 9.1. Qualitative Auswertung

Die berechnete Absorption der Probe wird mit der des Cut-off Kalibrators verglichen. OD-Werte über dem Cut-off sind als positiv, Werte unterhalb der Cut-off OD als negativ zu bewerten.

Werte im Bereich der Cut-off OD ( $\pm 20\%$ ) sind als Graubereich zu betrachten. Es wird empfohlen, die Bestimmung zu wiederholen oder 2 - 4 Wochen später eine neue Patientenprobe zu analysieren. In diesem Fall sollten beide Proben innerhalb eines Testlaufs untersucht werden.

Die optische Dichte des positiven Kalibrators muss mindestens doppelt so hoch sein wie die des Cut-off Kalibrators.

### 9.2 Quantitative Auswertung

Die Konzentrationen der MASTAZYME BRUCELLA IgG / IgM / IgA werden in Einheiten (U/mL) angegeben. Die exakten Konzentrationen sind auf den Etiketten der Kalibratoren angegeben. Die Extinktion wird entweder graphisch oder mittels Computersimulation gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen und die Konzentration der Patientenprobe direkt abgelesen oder berechnet.

Die quantitative Bestimmung der Antikörper gegen Brucella ermöglicht eine einfache zuverlässige Überwachung der entsprechenden Antikörpertiter zur Therapiekontrolle.

## 10. Testcharakteristika

Die Testcharakteristika der MASTAZYME BRUCELLA IgG / IgM / IgA ELISAs wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.



## 11. Literatur

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





	<b>Contents</b>	<b>Page</b>
1.	Intended Use	10
2.	Introduction	10
3.	Principle of the Test	10
4.	Kit Contents	11
5.	Materials Required but not Provided	11
6.	Warnings and Precautions	12
7.	Storage and Stability	12
8.	Specimen Collection and Handling	12
9.	Assay Procedure	13
10.	Results and Interpretation	14
11.	Assay Performance	14
12.	References	15



## 1. Intended Use

The MASTZYME BRUCELLA (*Brucella* spp.) Antibody ELISA has been designed for the detection and the quantification of specific IgG / IgM / IgA antibodies respectively against *Brucella* spp. in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be provided on request.

This assay is intended for *in-vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

## 2. Introduction

Brucellosis is an infectious disease caused by small ellipsoid, gram-negative bacteria. There are four different germs: *Br. abortus*, *Br. melitensis*, *Br. suis* and *Br. canis*. People are infected by contact with infected animals or by eating meat or drinking unpasteurized milk from infected animals. As a rule, infected humans are not contagious. Brucellosis is most frequent in young and middle-aged individuals. Endangered persons are butchers, farmers, owners of pets, veterinaries and tourists in Southern countries. The appearance of brucellosis shows a prevalence during winter and spring.

The incubation period is between one and three weeks, but may be as long as two months. *Br. abortus* and *Br. melitensis* may cause Bang's Disease or in rare cases Malta Fever. The first appears occasionally with a low pathogenicity for man. Typical symptoms for Bang's Disease are periodically occurring fever, splenomegaly and swelling of lymph nodes. In some cases an inflammation of different joints and organs occurs. The Malta Fever is caused by the epidemic type of brucellosis and infection almost always leads to a manifest illness. Some infections with *Brucella* can cause *Brucella* Hepatitis. It is possible that there is a link between an infection with *Brucella* and the outbreak of multiple sclerosis.

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

## 3. Principle of the Test

The principle of the test reaction can be described in four stages.

### 3.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to the antigens on the solid phase to form a stable immune complex. After 60 minutes incubation at room temperature the wells are washed with prediluted wash buffer to remove all non-reactive serum components.

### 3.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG /-IgM /-IgA horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG / IgM / IgA antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After a 30 minutes incubation at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with washing buffer.

### 3.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and subsequently the colour development is stopped after 20 minutes incubation at room temperature by adding 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to the wells. The change in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.



### 3.4 Reading and interpretation

The intensity of the colour is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600 - 690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

### 4. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. The strips and solutions have to be stored at 4 - 8 °C. The expiry date is mentioned on the labels.

12	Microtiter strips	single strips each with 8 break-apart wells coated with antigen of <i>Brucella abortus</i>
1 x	Frame holder	
4 x 2 mL	Calibrators 1 - 4	human serum containing antibodies against <i>Brucella</i> (concentrations listed below) diluted in PBS and stabilised with 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane as preservatives, ready to use

		IgG	IgM	IgA
Cal. 1 (negative)	Concentration (U/mL)	1	1	1
Cal. 2 (Cut-off)		10	10	10
Cal. 3 (weak positive)		40	50	50
Cal. 4 (positive)		150	200	200

1 x 60mL	Serum diluent	PBS/BSA buffer solution, contains < 0.1 % sodium azide as preservative, ready to use
1 x 12 mL	Enzyme conjugate solution	HRP-labelled goat anti-human-IgG /-IgM /-IgA, ready to use
1 x 12 mL	TMB substrate	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use
1 x 12 mL	Stopping solution	0.5 N sulfuric acid, ready to use
1 x 60mL	Washing buffer 10 x concentrated	PBS/Tween buffer solution 10 x concentrated to be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 min to avoid any crystals
2 x	Plate sealers	to cover microtiter strips during incubation
1 x	Plastic bag	re-sealable for dry storage of non-used strips

### 5. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500-µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600 – 690 nm)
- Microtiter Plate Washer (in case of manual washing: wash bottle)
- Reagent tubes for the serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of higher quality



## 6. Warning and Precautions

- For *in-vitro* diagnostic use only! Do not ingest or swallow! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera and plasma or buffers based upon have been tested to HBsAg, HIV and HCV respectively with generally accepted methods and were found negative. Nevertheless, precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 24 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination separate disposable pipet tips have to be used.
- No reagents from different kit lots should be used and they should not be mixed with one another.
- All reagents have to be used within shelf life.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or reading (ELISA Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents especially the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided because possible irritations and acid burns could arise and there exists a danger of intoxication.

## 7. Storage and Stability

Store all reagents at 4 - 8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted washing buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 4 - 8 °C.

## 8. Specimen Collection and Handling

Both serum and plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood which is aseptically drawn by venipuncture after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored at 4 - 8 °C for up to 48 hours. They should be kept at -20°C for a longer storage. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera must be prediluted **1:101** in **serum diluent** (e.g. 5 µL serum + 500 µL serum diluent) prior to testing.

Samples containing concentrations higher than the highest calibrator have to be diluted further with serum diluent.

In case of interference with rheumatic factors, serum preabsorption with Rf absorbant (MASTSORB Order Code: 651003) is recommended. Do **not** absorb the calibrators.



## 9. Assay Procedure

### 9.1. Preparation of Reagents

**Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18 – 24 °C) prior to use and mix well.**

**Washing buffer:** Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated **washing buffer 1:10 with distilled water** (e.g. 60 mL buffer concentrate + 540 mL distilled water). Mix thoroughly.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. Any changes or modifications are within the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Put the unused microtiter strips back in the plastic bag and store them dry at 4 - 8 °C.

### 9.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for calibrators, controls and samples.

**Note: Other incubation conditions might be possible. In case of modifications of the recommended test procedure (e.g. incubation temperature 37 °C instead of RT) the user has to validate assay performance.**

1. Pipette **100 µL** each of the **diluted (1:101) samples** and the **ready to use calibrators** into the appropriate wells.
2. Cover plate with the enclosed plate sealing foil and **incubate** at room temperature for **60 minutes**.
3. Discard the contents of the microwells and wash **3 times** with **300 µL** of **diluted washing buffer**. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
4. Pipette **100 µL** of **enzyme conjugate** solution into each well.
5. Cover plate with plate sealing foil and **incubate** for **30 minutes** at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash **3 times** with **300 µL** of **diluted washing buffer**. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
7. Dispense **100 µL** of **TMB substrate** into each well.
8. Cover plate with the plate sealing foil and **incubate** for **20 minutes** in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add **100 µL** of **stopping solution** to each well.
10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, **read the optical density at 450 nm** and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600 - 690 nm is recommended.

**The developed colour is stable for at least 60 minutes. Read optical densities during this time.**



## 10. Results and Interpretation

### Example

	OD 450 nm	corrected OD	Mean OD Value
Blank	0.020		
Calibrator 1 (negative)	0.077 / 0.059	0.057 / 0.039	0.048
Calibrator 2 (cut-off)	0.537 / 0.501	0.517 / 0.481	0.499
Calibrator 3 (weak positive)	1.069 / 1.103	1.049 / 1.083	1.066
Calibrator 4 (positive)	2.041 / 2.069	2.021 / 2.049	2.035

The table above should be considered as an example which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. These data do NOT describe **reference values** which have to be found in other laboratories in the same way!

### 10.1. Qualitative Calculation

The calculated OD values for patient sera as mentioned above are compared with the value for the cut-off calibrator. If the value of the sample is higher, then it should be read as positive.

A value below the cut-off calibrator should be read as negative. It seems reasonable to define a range of  $\pm 20\%$  around the value of the cut-off as a grey zone. It is recommended to repeat results laying within the grey zone using the same serum or a new sample of the same patient, taken after 2 - 4 weeks. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive calibrator must show an absorption value at least double the value received by the cut-off calibrator.

### 10.2 Quantitative Calculation

The ready to use calibrators of the BRUCELLA antibody kit are defined and values expressed are in arbitrary units (U/mL). This gives access to an exact and reproducible quantification and in consequence patient antibody titer monitoring is possible. Concentration values for calibrators are printed on the labels of the vials.

A standard curve is plotted by entering the mean absorbance value of the calibrators on the Y-axis and the corresponding concentration on the X-axis using graph paper. The concentration of the patient samples can then be read directly from the graph.

The calculation of the result can be performed using a computer and a suitable software program.

## 11. Assay Performance

The assay characteristics of the MASTAZYME BRUCELLA IgG / IgM / IgA ELISAs have been established and assessed according the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.



## 12. References

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



<b>Sommaire</b>		<b>Page</b>
1.	Domaine d'utilisation	17
2.	Introduction	17
3.	Principe du test	17
4.	Composition du coffret	18
5.	Matériel nécessaire mais non fourni	19
6.	Précautions d'utilisation	19
7.	Conservation et stabilité	20
8.	Prélèvement et transport des échantillons	20
9.	Procédure ELISA	21
10.	Résultats et interprétation	22
11.	Performances du test	22
12.	Bibliographie	23





## 1. Domaine d'utilisation

Le coffret MASTAZYME BRUCELLA (*Brucella* spp.) a été conçu pour la détection et la quantification des anticorps IgG / IgM / IgA dirigés contre *Brucella* dans le sérum et le plasma. Des applications supplémentaires sur d'autres prélèvements biologiques sont possibles et peuvent être fournies sur demande.

Diagnostic *in vitro* uniquement.

Tous les résultats d'analyses doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques. Le tableau clinique et les tests supplémentaires doivent également être pris en compte.

## 2. Introduction

La brucellose est une maladie infectieuse provoquée par une petite bactérie ellipsoïde gram négative. Il y a quatre germes différents : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* et *B. canis*. Les hommes sont contaminés par contact avec des animaux infectés ou en consommant de la viande ou en buvant du lait non pasteurisé provenant d'animaux infectés. Les humains infectés ne sont pas contagieux. La brucellose est plus fréquente chez les personnes jeunes. Les personnes à risques sont les bouchers, les fermiers, les propriétaires d'animaux de compagnie, les vétérinaires et les touristes dans les pays du Sud. L'apparition de la brucellose montre une prévalence plus élevée pendant l'hiver et le printemps.

La période d'incubation varie d'une à trois semaines et peut durer jusqu'à deux mois. *B. abortus* et *B. melitensis* peuvent provoquer la maladie de Bang ou dans de rares cas la fièvre de Malte. La première apparaît occasionnellement avec une faible pouvoir pathogène pour l'Homme. Les symptômes typiques de la maladie de Bang sont des fièvres périodiques, une splénomégalie et un gonflement des ganglions lymphatiques. Dans quelques cas une inflammation des articulations et des organes peut apparaître. La fièvre de Malte est due au type épidémique de Brucellose et l'infection conduit à une maladie manifeste. Certaines infections à *Brucella* peuvent provoquer une hépatite. Il est possible qu'il existe un lien entre une infection à *Brucella* et l'apparition de scléroses multiples.

Sous antibiothérapie ou lors d'une infection chronique, la détection des brucelles dans le sang, l'urine, le liquide cébrospinal, les crachats ou d'autres fluides biologiques peut être négative. Les méthodes sérologiques comme l'agglutination, la fixation du complément, le test de Coombs et l'ELISA constituent une bonne alternative. Le suivi des anticorps peut servir d'indication sur le stade de l'infection. Pendant les premiers jours de l'infection, les IgA et les IgM sont les seules immunoglobulines qui apparaissent. Lors de la progression de la maladie, les IgA et les IgM diminuent quantitativement et les IgG deviennent prédominantes. Lors d'une brucellose chronique les IgG peuvent être produites sur de longues périodes.

## 3. Principe du test

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

### 3.1 Incubation des sérums

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes adsorbés sur la phase solide pour former des complexes immuns stables. Après une incubation de 60 minutes à température ambiante, les puits sont lavés avec la solution de lavage prédiluée afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

### 3.2 Incubation du conjugué

Le conjugué anti-IgG /-IgM /-IgA humaines marqué à la peroxydase du Raifort est ajouté dans tous les puits. Il se lie aux anticorps IgG / IgM / IgA des complexes immuns adsorbés sur la phase solide. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le conjugué en excès est éliminé par lavage de tous les puits avec la solution de lavage.



### 3.3 Réaction du substrat et de la solution stop

Le substrat TMB est déposé dans tous les puits et le développement de la réaction donne une coloration stable bleu. Le développement de la réaction est stoppée après 20 minutes d'incubation à température ambiante par ajout d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5 N dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

### 3.4 Lecture et interprétation

L'intensité de coloration est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm (filtre de référence recommandé pour la lecture bichromatique : 600 - 690 nm). L'intensité de coloration (DO) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient.

## 4. Composition du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires et suffisants pour 12 x 8 = 96 déterminations. Les barrettes et les solutions doivent être stockées à 4 - 8 °C. La date de péremption est inscrite sur les étiquettes.

12 barrettes	Barrettes de microtitration	Barrettes sécables de 8 puits sensibilisées avec l'antigène de <i>Brucella abortus</i> .
1 x	Cadre de microplaque	
4 x 2 mL	Calibrateurs 1 - 4	Sérums humains contenant des anticorps anti-Brucella (concentrations ci-dessous) dilués dans du PBS et stabilisés avec 0,01 % de méthylisothiazolone et 0,01 % de bromonitrodioxane comme conservateurs, prêts à l'emploi.

		IgG	IgM	IgA
Cal. 1 (négatif)	Concentration (U/mL)	1	1	1
Cal. 2 (seuil)		10	10	10
Cal. 3 (positif faible)		40	50	50
Cal. 4 (positif)		150	200	200

1 x 60 mL	Diluant des sérums	Solution tampon PBS/BSA, contient < 0.1 % d'azoture de sodium comme conservateur, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Conjugué	Conjugué HRP de chèvre anti-IgG /-IgM /-IgA humaines, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Substrat TMB	3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Solution Stop	Acide sulfurique 0.5 N, prêt à l'emploi.
1 x 60 mL	Solution de lavage concentrée 10 x	Solution tampon PBS/Tween concentrée 10 x à diluer au 1 : 10 avant utilisation; la solution concentrée peut être chauffée à 37 °C pour éviter la formation de cristaux.
2 x	Films adhésifs	pour couvrir les barrettes de la microplaque pendant les incubations.
1 x	Sac plastique	refermable pour éviter l'humidité sur les barrettes non utilisées.



## 5. Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et pipettes multicanaux de 5  $\mu$ L, 100  $\mu$ L et 500  $\mu$ L
- Lecteur de microplaques avec filtre à 450 nm (filtre de référence 600 - 690 nm)
- Laveur automatique de microplaques (en cas de lavage manuel : pissette)
- Tubes pour la dilution des sérums
- Cylindre de mesure
- Eau distillée ou ultra pure

## 6. Précautions d'utilisation

- Usage *in vitro* uniquement! Ne pas ingérer ou avaler ! les mesures de sécurité du laboratoire doivent être suivies. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
- Tous les sérums et réactifs inclus dans le coffret ont été trouvés négatifs pour l'antigène Hbs, le VIH et le VHC. Cependant, des précautions telles que le port de gants doivent être prises.
- Si des sérums ou des réactifs sont renversés, nettoyer la surface avec une solution désinfectante (ex : eau de Javel à 5 %) puis jeter dans des récipients adaptés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18 – 24 °C) avant de commencer le test.
- Avant de pipeter, tous les réactifs doivent être mélangés doucement en les inclinant ou en les retournant doucement. Eviter la formation de mousse par des mélanges trop vigoureux.
- Il est important de distribuer les réactifs avec des intervalles de temps constants pour que tous les puits de la microplaques soient dans les mêmes conditions.
- Veillez à ne pas contaminer les bouchons des flacons de réactifs Eviter les risques de mélange des réactifs. Le contenu des flacons est souvent sensible à l'oxydation, ils doivent donc rester ouvert le moins longtemps possible.
- Changer d'embouts de pipette entre chaque réactif ou sérum afin d'éviter les contaminations.
- Ne pas échanger les réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser le coffret au delà de la date de péremption.
- Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires ou la norme ISO 9001 tous les matériels de laboratoire utilisés doivent être vérifiés régulièrement pour l'exactitude et la précision. Ceci comprend, les micropipettes et l'instrumentation ELISA telle que le lecteur et le laveur.
- Eviter le contact de la solution stop et du substrat avec la peau, les yeux et les muqueuses car ils peuvent provoquer des irritations ou des brûlures acides. De plus, il existe un risque d'intoxication.



## 7. Conservation et stabilité

Conserver tous les réactifs à 4 – 8 °C.

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur son étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date de péremption.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 4 – 8 °C.

## 8. Prélèvement et transport des échantillons

Le sérum ou le plasma (EDTA, héparine) peuvent être utilisés pour le test. Prélever le sang aseptiquement puis séparer le sérum par centrifugation après coagulation. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés pendant 48 heures à 4 – 8 °C. Ils doivent être conservés à -20 °C pour des durées plus longues. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée. Les échantillons hyperlipidiques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Les échantillons de sérum doivent être prédilués au **1:101** dans le diluant des sérums (ex : 5 µL de sérum + 500 µL de diluant des sérums) avant le test.

Les échantillons ayant des concentrations supérieures au plus fort calibrateur doivent être redilués dans le diluant des sérums.

En cas d'interférences avec le facteur rhumatoïde, il est conseillé d'adsorber les échantillons avec l'adsorbant (MASTSORB Code: 651003). **Ne pas adsorber les calibrateurs.**



## 9. Procédure ELISA

### 9.1. Préparation des réactifs

**Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18-24°C) avant utilisation et bien les mélanger.**

**Solution de lavage :** Dissoudre les éventuels cristaux en chauffant à 37 °C et bien mélanger.

Diluer la solution de lavage concentrée au **1:10 avec de l'eau distillée** (ex : 60 mL de solution de lavage concentrée + 540 mL d'eau distillée).  
Mélanger minutieusement

- Suivre strictement les instructions pour obtenir de bons résultats. Tous changements ou modifications sont sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas rester à cette température plus longtemps que nécessaire.
- Une courbe étalon doit être réalisée pour chaque test.
- Conserver les barrettes non utilisées dans leur sac plastique à 4 – 8 °C.

### 9.2. Test ELISA

Préparer la quantité suffisante de puits pour les calibrateurs, les contrôles et les échantillons.

**Remarque :** **D'autres conditions d'incubation peuvent être utilisées. En cas de modifications dans la procédure du test (ex : incubation à 37 °C au lieu de la température ambiante) l'utilisateur doit valider les performances du test.**

1. Déposer **100 µL** de **chaque échantillon dilué** (1 : 101) et de **chaque calibrateur prêt à l'emploi** dans les puits appropriés.
2. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant **60 minutes**.
3. Eliminer le contenu des puits et laver **3 fois** avec **300 µL de solution de lavage diluée**. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
4. Déposer **100 µL** de **conjugué** dans chaque puits.
5. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant **30 minutes**.
6. Eliminer le contenu des puits et laver **3 fois** avec **300 µL de solution de lavage diluée**. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Distribuer **100 µL** de **substrat** dans tous les puits.
8. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et **incuber** pendant **20 minutes** dans le noir (ex: dans un tiroir) à température ambiante.
9. Ajouter **100 µL** de solution d'arrêt dans chaque puits.
10. Mélanger doucement, essuyer le dessous de la microplaque et **lire la densité optique à 450 nm**. Calculer les résultats. Blanc contre l'air. Une lecture bichromatique utilisant un filtre de référence à 600 – 690 nm est recommandée.

**La couleur est stable pendant au moins 60 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.**



## 10. Résultats et interprétation

### Exemple

	DO 450 nm	DO nettes	DO moyennes
Blanc	0,020		
Calibrateur 1 (négatif)	0,077 / 0,059	0,057 / 0,039	0,048
Calibrateur 2 (seuil)	0,537 / 0,501	0,517 / 0,481	0,499
Calibrateur 3 (positif faible)	1,069 / 1,103	1,049 / 1,083	1,066
Calibrateur 4 (positif)	2,041 / 2,069	2,021 / 2,049	2,035

Le tableau ci-dessus doit être considéré comme un exemple obtenu dans des conditions arbitraires de température et d'environnement. Il ne s'agit pas des valeurs de référence à retrouver par d'autres laboratoires dans les mêmes conditions!

### 10.1. Résultats qualitatifs

Les valeurs de DO nettes calculées pour les sérums des patients sont comparées avec la valeur du calibrateur seuil. Si la valeur de l'échantillon est supérieure à la valeur du seuil, le résultat est positif.

Si la valeur de l'échantillon est inférieure à celle du seuil, le résultat est négatif. Il semble raisonnable de définir une zone de  $\pm 20\%$  autour de la valeur du seuil comme zone grise. Il est recommandé de répéter les tests pour les échantillons dont la valeur se situe dans cette zone grise en utilisant le même sérum ou avec un nouvel échantillon prélevé 2 à 4 semaines après. Les deux échantillons peuvent être testés en parallèle dans la même série.

La valeur du calibrateur positif doit être au moins du double de celle du seuil.

### 10.2 Résultats quantitatifs

Les calibrateurs prêts à l'emploi du coffret MASTAZYME BRUCELLA ont des valeurs exprimées en unités arbitraires (U/mL). Ceci donne accès à une quantification exacte et reproductible permettant de suivre l'évolution du titre en anticorps. Les concentrations des calibrateurs sont imprimées sur les étiquettes des flacons.

Tracer la courbe étalon en portant les concentrations des calibrateurs sur l'axe des abscisses et la valeur moyenne d'absorbance correspondante sur l'axe des ordonnées. La concentration en anticorps du sérum du patient peut être lue directement sur la courbe.

Le calcul des résultats peut être fait en utilisant un ordinateur et le logiciel correspondant.

## 11. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME BRUCELLA IgG / IgM / IgA ELISA ont été établies et évaluées en accord avec la directive Européenne de Diagnostic In Vitro. Les données de la validation peuvent être obtenue sur demande spéciale.



## 12. Bibliographie

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



**Hersteller / Manufactured by / Fabriqué par:**  
(Vertrieb Zentral- und Osteuropa)

## **MAST DIAGNOSTICA**

Laboratoriums-Präparate GmbH  
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld  
Tel.: +49 (0) 4533 2007-0  
Fax: +49 (0) 4533 2007-68  
E-Mail: [mast@mast-diagnostica.de](mailto:mast@mast-diagnostica.de)  
<http://www.mast-diagnostica.de>

**Distributed by:**

**MAST GROUP Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
UK-Mersey Side L20 1EA  
Great Britain  
Phone: +44 151 9337277  
Fax: +44 151 9441332  
E-mail: [sales@mastgrp.com](mailto:sales@mastgrp.com)  
  
<http://www.mastgrp.com>

**Distribué per:**

**MAST DIAGNOSTIC**  
115, rue Jules Barni  
80000 Amiens  
France  
Phone: +33 3 22808067  
Fax: +33 3 22809922  
E-mail: [service-commercial@mast-diagnostic.fr](mailto:service-commercial@mast-diagnostic.fr)  
  
<http://www.mastgrp.com>