

SeroPertussis™ IgA/IgM

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
pro stanovení protilátek IgA a/nebo IgM proti
Bordetelle Pertussis v lidském séru.

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č. A233-01)

Skladujte při 2–8°C. Nezmrazujte.
Pouze pro *In Vitro* stanovení.
Pouze pro profesionální použití

Dováží: GALI spol. s r.o.
Ke Stadionu 179, Semily 513 01
Tel. 481 689 050
Fax. 481 689 051
E-mail: info@gali.cz

Vyrábí: Savyon Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel. +972.8.8562920
Fax. +972.8.8523176

E-mail: support@savondiagnosics.com

Použití

Tento test se používá pro kvalitativní stanovení specifických IgA/IgM protilátek proti *Bordetelle Pertussis* ve vzorku lidského séra metodou ELISA..

Tato souprava se může používat jako dvě nezávislé soupravy, buď na detekci IgA nebo IgM protilátek, nebo obojích.

Pro *In Vitro* diagnostické účely . Pouze pro profesionální použití.

Úvod

Černý kašel (Pertussis) je vysoce nakažlivá bakteriální infekce respiračního traktu, způsobená *Bordetellou pertussis* – gram-negativní bakterie. U dětí se typicky projevuje záchvatovým, křečovitým kašlem a zvracením po kašli. Tyto stavy přetrvávají mnoho týdnů.

Černý kašel je endemické onemocnění, ale epidemie se vyskytují každých 3-5 let. V USA je hlášeno 5000-7000 případů ročně. Výskyt černého kašle byl rapidně omezen hromadným očkováním. Nicméně i v zemích, ve kterých je očkování vysoce rozšířeno, se onemocnění objevuje⁽¹⁾. Celosvětově je diagnostikováno téměř 50 miliónů případů černého kašle a okolo 350 000 lidí na tuto chorobu umírá⁽²⁾. Výskyt černého kašle stoupá postupně od roku 1980⁽³⁾. Uměle získaná imunita po očkování se po 5-10 letech ztrácí, a očkování hostitel se stává k infekci náchylným. Infekce se u očkovaných lidí projevuje jako mírnější nespecifické onemocnění, bez klasické klinické fáze. Černý kašel je

patrný pouze v 6% takových případech. Onemocnění se projevuje nespecifickým, několik týdnů až měsíců, přetrvávajícím kašlem. Vzhledem k těmto atypickým symptomům, je diagnostika černého kašle u dospělých a dospívajících značně podhodnocena. Tyto jedinci mohou být zdrojem infekce pro neočkované kojence⁽⁴⁾. Pro děti, které jsou příliš mladé, na to aby byly kompletně očkovány, a pro děti, které ještě nedostaly sérii primárních očkování. Tam je riziko onemocnění vysoké.

Onemocnění je velice nakažlivé, u více než 90% jedinců, dojde po expozici v domácím prostředí ke klinickému onemocnění.

Časná anti-mikrobiální léčba redukuje sílu symptomů, a omezuje periodu nakažlivosti. Časná identifikace případů může pomoci při prevenci, neočkovaných lidí nebo lidí očkovaných před dlouhou dobou. Používá se anti-mikrobiální prevence a nebo očkování.

Laboratorní diagnostika černého kašle se provádí: přímo kultivací, DFA nebo PCR a nepřímo serologickými testy. Během prvních dvou týdnů infekce, může být bakterie v horním dýchacím traktu prokázána pouze přímou metodou. Pro přímou metodu se preferují naso-faryngeální vzorky (odsáté nebo na tampónu). Serologické testy jsou užitečné při diagnostice atypických infekcí, s přetrvávajícím kašlem, a pro epidemiologické účely. Zvýšené hladiny protilátek proti Pertussis Toxin (PT) a Filamentous Hemagglutinin (FHA) jsou považovány za citlivé serologické markery pro diagnostiku dospělých a neočkovaných dětí⁽⁵⁾. U neočkovaných dětí je nutné, zvýšené hladiny protilátek jak imunoglobulinu G (IgG) tak imunoglobulinu A (IgA), posílat k WHO k definitivnímu potvrzení diagnostiky černého kašle. U očkovaných dětí postačí k diagnostice černého kašle jeden vzorek séra⁽⁶⁾.

Test SeroPertussis™ IgG a Test SeroPertussis™ IgA/IgM se používají k doplnění PT a FHA (antigen) testů. Umožňují kvalitativní stanovení IgA a / nebo IgM protilátek a semi-quantitativní stanovení IgG protilátek k *Bordetelle pertussis*.

Princip testu.

- Mikrotitrační destička je kautovaná obohacenou frakcí toxinu *Bordetelly pertussis* a vláknitým hemagglutininem.
- Testované sérum, ředění 1/100, se inkubuje v jamkách mikrotitrační destičky. Specifická protilátka přítomná v séru pacienta se naváže na antigen navázaný na mikrodestičce.
- Nespecifické protilátky jsou odstraněny promytím.
- Dále se přidává křenová peroxidáza (HRP) konjugovaná s anti-lidskou IgA a/nebo IgM. Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen-protilátka, HRP značená protilátka se naváže na protilátku a vytvoří komplex.
- Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím.
- V dalším kroku je do jamek přidáván chromogenní substrát, který při pozitivní enzymatické reakci vytvoří modré zbarvení.
- Enzymatická reakce je ukončena stop činidlem (1M H₂SO₄). Modré zbarvení se změní na žluté. Absorbance se měří při 450/620 nm.
- Hodnota absorbance je proporcionálně úměrná hladině specifických protilátek navázaných na kautované antigeny.

Přehled kroků

Do mikrotitračních jamek, které jsou pokryty specifickými immunodominantními *B. pertussis* proteiny, přidejte 50µl Cut Off kontroly, negativní kontroly, pozitivní kontroly, a naředěných vzorků v poměru 1/100

↓

destičku přikryjte a inkubujte 1h při 37°C ve 100% vlhkosti

↓

3x promyjte promývacím pufr

↓

přidejte 50µl HRP konjugátu naředěného v poměru 1/300

↓

destičku přikryjte a inkubujte 1h při 37°C ve 100% vlhkosti

↓

3x promyjte promývacím pufr

↓

přidejte 100µl TMB-Substrátu

↓

Destičku přikryjte a inkubujte 15min při laboratorní teplotě

↓

přidejte 100µl Stop roztoku

↓

Absorbanci odečítejte při 450/620nm

↓

Vypočítejte a interpretujte výsledky

Součásti kitu

Souprava na 96 stanovení

Kat. číslo. A233-01

- 1. Mikrotitrační destička kautovaná antigenem *B. pertussis*:** 96 odlamovatelných jamek (8x12) kautovaných antigeny *Bordetella pertussis*, zabalené v hliníkové fólii se sušidlem.
1 destička
- 2. Koncentrovaný promývací pufr (20X):** PBS - Tween pufr. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 100ml
- 3. Roztok k ředění sér-RT:** Roztok pufru, v pracovní koncentraci, obsahuje anti-lidské IgG. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 60ml
- 4. Roztok k ředění konjugátu:** V pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 40ml
- 5. Negativní kontrola IgA a IgM:** Lidské sérum bez obsahu IgA a IgM protilátek k *B. pertussis*. V pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku..
1 lahvička, 2ml
- 6. Positivní kontrola IgA a IgM:** Lidské sérum pozitivní na IgA a IgM protilátky proti *B. pertussis*. V pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2ml
- 7. Cut-Off kontrola IgA:** V pracovní koncentraci. Kalibrátor obsahující lidské IgA protilátky specifické k *B. pertussis*, používá se pro stanovení cut off.

S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.

1 lahvička, 2.5ml

- 8. Cut-Off kontrola IgM:** V pracovní koncentraci. Kalibrátor obsahující lidské IgM protilátky specifické k *B. pertussis*, používá se pro stanovení cut off. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2.5ml
- 9. Koncentrovaný HRP konjugát IgA (300x):** anti-lidské IgA (α řetězec specifický). S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 0.2ml
- 10. Koncentrovaný HRP konjugát IgM (300x):** anti-lidské IgM (μ řetězec specifický). S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 0.2ml
- 11. TMB substrát:** v pracovní koncentraci, obsahuje 3,3',5,5'- tetramethylbenzidin jako chromogen a peroxid jako substrát
1 lahvička, 14ml
- 12. Stop roztok:** V pracovní koncentraci. Obsahující 1M H₂SO₄.
1 lahvička, 15ml
- 13. Fólie na přikrytí destiček:** 1
- 14. Návod k použití:** 1

Potřebný materiál, nedodávaný v soupravě

1. naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta
2. plastové zkumavky na jedno použití pro ředění HRP konjugátu
3. vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000 µl) a špičky
4. jednolitrová volumetrická láhev
5. 50 ml volumetrický váleček
6. promývací nádoba
7. filtrační papír
8. vortexové míchadlo
9. vodní lázeň s víčkem (37± 1°C) nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37± 1°C)
10. reader s filtrem 450 / 620 nm pro měření mikrodestiček
11. destilovaná nebo dvakrát deionizovaná voda pro ředění promývacího pufru (Wash Buffer)

Upozornění

Pouze pro *In-Vitro* diagnostické použití!

1. Tato souprava obsahuje lidská séra, která byla testována technikami podle FDA. Séra jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HCV a HIV, nicméně, jelikož žádná známá metoda nemůže zaručit s úplnou jistotou, že výrobky derivované z lidské krve nepřenesou infekci, se všemi komponenty z lidské krve, obsaženými v této soupravě se musí zacházet jako s potenciálně infekčním sérem nebo krví, způsobem identickým (nebo podobným) s doporučením publikovaným v CDC/NIH manuálu „Biobezpečnost mikrobiologických a lékařských laboratořích“, 1988.
2. Roztok chromogenního substrátu působí dráždivě na pokožku a mukózní membrány. Vyvarujte se přímého kontaktu.

- Všechny součásti kitu jsou kalibrovány na danou šarži. Kombinování součástí kitů různých šarží může ovlivnit výsledek stanovení.
- Kyselina sírová 1M H₂SO₄, je pro oči a pokožku dráždivá. V případě kontaktu s oční sliznicí, vyplachujte oko proudem vody.

Uchovávání a trvanlivost reagensů

- Všechny dodávané materiály je nutno skladovat při teplotě 2 až 8°C. Reagencie, uchovávané při teplotě 2 až 8°C, jsou stabilní do data expirace, vyznačeného na obalu soupravy. Expozice složek soupravy obyčejné teplotě po dobu několika hodin nezpůsobí zničení reagensů. **Reagencie nezmrazujte.**
- Životnost kitu po otevření je 90 dní.
- Nepoužité stripy se musí skladovat v hliníkové fólii společně se sušidlem.
- V koncentrovaném promývacím pufru 20x se mohou během skladování tvořit krystalky. Toto je běžné. Krystalky rozpustíte zahřátím pufru na 37°C ještě před jeho ředěním. Naředěný pufr skladujte při 2-8°C a to po dobu maximálně 21 dní.

Odběr vzorků

Vzorky séra se odebírají asepticky standardními technikami. Tepelně inaktivovaná séra nemohou být použita. Nedoporučuje se použití lipemických, zakalených a kontaminovaných séra. Drobné částice a sraženiny v séru mohou způsobovat chybné výsledky. Tyto vzorky by měly být před stanovením vyčiřeny centrifugací nebo filtrací.

Skladování vzorků

Vzorky by se měly skladovat při teplotě 2-8°C pokud jsou testovány během 7 dní (doporučuje se přidávek 0,1% azidu sodného). Pro delší uchování je nutno alikvoty séra uchovávat při teplotě -20°C. Vyhněte se opakovanému mrazení a rozmrazování séra.

Pracovní postup - Ruční

Aplikační listy pro automatické zpracování jsou na vyžádání

Stejný postup se používá pro IgA i IgM.

A. Příprava reagensů.

- Všechny testovací reagenty před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte Cut-Off kontrola, negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky séra.
- Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuto měření negativní kontroly, pozitivní kontroly a dvou jamek s cut off kontrolou.
- Vyjměte mikrodestičku z hliníkové fólie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných vzorků) z 96 jamkového rámečku. Nepoužité stripy musí být vráceny do hliníkového sáčku se sušidlem. Sáček je nutno důkladně uzavřít.
- Zřeďte 1/20 koncentrovaný promývací pufr deionizovanou nebo destilovanou vodou. Pro příklad: pro přípravu 1 L promývacího pufru přidejte k 50ml

koncentrovaného roztoku promývacího pufru 950ml dvakrát deionizované nebo destilované vody.

B. Inkubace vzorků séra a kontrol.

- Nařeďte každý vzorek pacienta v poměru 1/100 následovně: přidejte 10μl séra pacienta k 190μl roztoku pro ředění sér-RT (1/20). A následně přidejte 25μl takto získaného roztoku 1/20 ke 100μl roztoku k ředění sér-RT.
- Pipetujte 50μl cut-off kontroly IgA a/nebo IgM, 50μl negativní kontroly, 50μl pozitivní kontroly a 50μl sér naředěných v poměru 1/100 do příslušných jamek na stripu.
- Přikryjte strip víčkem a dejte inkubovat na 1 hodinu do mrazné komory (37°C).
- Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek.
- Promývací krok:**
Ruční promývání: naplňte každou jamku promývacím pufrům po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 3x.
Automatické promývání: naplňte každou jamku promývacím pufrům (300-350μl) po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 3x.
- Osušte stripy a rámeček jemným poklepáním na absorpčním papíru.

C. Inkubace s konjugátem.

- Koncentrovaný roztok HRP-konjugátu IgA nebo IgM zřeďte do pracovní koncentrace těsně před použitím v poměru 1/300 roztokem Conjugate Diluent. Např. pro dva stripy připravte minimálně 3 ml zředěného HRP-konjugátu následovně: 10μl koncentrovaného roztoku HRP-konjugátu IgA nebo IgM a smíchejte s 3 ml roztoku Conjugate Diluent.
- Odpipetujte 50μl zředěného konjugátu do každé z jamek.
- Přikryjte strip víčkem a inkubujte 1 hodinu při 37°C v mrazné komoře.
- Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek a proveďte promývací krok, jak je uvedeno v bodě 9-10.

D. Inkubování s TMB-substrátem.

- Odpipetujte 100μl roztoku TMB-Substrate do každé z jamek, přikryjte víčkem a inkubujte při laboratorní teplotě 15 min.
- Reakci ukončete přidáním 100μl roztoku Stop roztoku (1 M H₂SO₄) do každé z jamek.

E. Odečtení výsledků.

- Proměřte absorbanci při 450/620 nm a výsledek zapište. Odečtení může být provedeno do 30 min od zastavení chromogenní reakce.
 - Pozn.: Před odečtením nesmí jamka obsahovat žádné bublinky. Dno destičky musí být opatrně otřeno.*

Validita testu

Test je validní, jestliže jsou splněna následující kritéria: Pokud nejsou splněny tyto podmínky, není test validní a musí být zopakován.

- OD_{Pozitivní kontrola} ≥ 1.0
- Ratio OD_{Pozitivní kontrola} / OD_{Cut Off} > 2.0
- OD_{Negativní kontrola} is < 0.25

Výpočet výsledků

1. Vypočítá se průměrná hodnota absorbance Cut-Off kontrola ze dvou naměřených hodnot.
2. Podle následujícího vzorečku se vypočítá Cut-off index (COI), tím se normalizuje výsledek získaný různými testy.
3. $COI = \text{Absorbance vzorku séra} / OD \text{ průměrná hodnota Cut-Off kontrola (COC)}$.

Interpretace výsledků

Interpretace pro IgA i IgM

Absorbance at 450nm	COI	Výsledek	Diagnostická Interpretace
$O.D < COC$	<1.0	Negativní Nedetekovatelné IgA nebo IgM protilátky	Žádné náznaky infekce <i>B.pertussis</i> (viz. Limitace testu)
$COC \leq O.D \leq 1.1 \times COC$	1-1.1	Hraniční Po 2-4 týdnech by se měl odebrat a testovat druhý vzorek séra. (Pokud je i druhý vzorek hraniční, měl by se výsledek považovat za negativní)	
$O.D > 1.1 \times COC$	>1.1	Positivní Významná hladina IgA a/nebo IgM protilátek	Indikuje probíhající infekci <i>B.pertussis</i>.

Ke získání kompletního protilátkového profilu, by mělo být testováno IgA, IgM a IgG

Interpretace výsledků založených na detekci IgA, IgM a IgG protilátek.

Bordetella Pertussis			
IgG	IgM	IgA	
Negativní	Negativní	Negativní	Neindikuje infekci <i>B.pertussis</i> (viz. limitace)
Negativní nebo Positivní	Positivní	Negativní nebo Positivní	Vypovídá o současné infekci
Positivní nebo Negativní	Negativní	Positivní	Vypovídá o nedávno prodělané infekci
Positivní	Negativní	Negativní nebo Positivní	Vypovídá o nedávné nebo minulé infekci nebo o minulé imunizaci

Omezení testu

- Jednotlivé serologické testy nemohou být používány jako jediné kritérium pro stanovení diagnózy. Musí se brát v úvahu všechny klinické a laboratorní výsledky.
- Vzorky, které byly odebrány příliš brzo během primární infekce nemusí obsahovat detekovatelné množství protilátek. Pokud je podezření na *B.pertussis*, měl by se během 2-4 týdnů odebrat další vzorek na analýzu. Ten by se měl testovat paralelně s prvním vzorkem.
- Pokud se infekce předpokládá u dětí mladších 6 měsíců, měla by se použít metoda pro detekci antigenu (kultivace, PCR), jelikož u dětí mladší 6 měsíců se zřídka tvoří protilátky.

Chování testu

Přesnost pro IgA

IgA Intra-assay (within-run) přesnost:

Vzorek	Počet opakování	Střední OD hodnota	CV%
Positivní	10	0.857	5.4
Negativní	10	0.225	5.1

IgA Inter-assay (between-run) přesnost:

Vzorek	Počet opakování	Střední OD hodnota	CV%
Positivní	10	0.911	5.6
Negativní	10	0.147	6.1

Přesnost pro IgM

IgM Intra-assay (within-run) přesnost:

Vzorek	Počet opakování	Střední OD hodnota	CV%
Positivní	10	0.862	3.1
Negativní	10	0.280	2.4

IgM Inter-assay (between-run) přesnost:

Vzorek	Počet opakování	Střední OD hodnota	CV%
Positivní	10	0.906	5.7
Negativní	10	0.238	6.9

Literatura

1. Melker H.E. et al., Emerging Infectious Diseases 6(4), 2000. Centers of Disease Control
2. Liberti G.E. (editor), Med Sci Bull. 19(3): 5. 1996
3. CDC report, February 1998
4. Srugo I. et al., Emerging Infectious Diseases 6(5), 2000. Centers for Diseases Control
5. Trollfors B. et al., Clinical Infectious Diseases 1999; 28; 552-9
6. Muller F-M.c. et al., J. Clin. Micro. 1997; 35(10); 2435-2443



European Authorized Representative: Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels, Belgium
Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net

	Teplotní omezení
	Čtěte pozorně příbalový leták
	Pro In Vitro diagnostické účely
	Výrobce
	Autorizovaný Evropský zástupce