



SeroPertussis™ IgG

Ενζυμικός ανοσοπροσοροφητικός
προσδιορισμός (ELISA)
για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό
ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι της
Bordetella Pertussis
σε ανθρώπινο ορό

Φυλλάδιο οδηγιών

Διαγνωστικό σύνολο για 96
προσδιορισμούς
(Αρ. καταλόγου A231-01)

Για In Vitro διαγνωστική χρήση
Μόνο για επαγγελματική χρήση
Φυλάσσετε στους 2-8° C. **Μην
καταψύχετε**

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St.
Ashdod 77610
ISRAEL
Τηλ.: +972.8.8562920
Φαξ: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnosics.com

Προοριζόμενη χρήση

Το διαγνωστικό σύνολο SeroPertussis™ IgG είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσοροφητικός προσδιορισμός (ELISA) για τον προσδιορισμό ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι της *Bordetella pertussis*.

Για **In Vitro** διαγνωστική χρήση. Μόνο για επαγγελματική χρήση.

Εισαγωγή

Ο κοκκύτης (Pertussis) είναι μια εξαιρετικά μεταδοτική βακτηριακή λοίμωξη του αναπνευστικού, η οποία προκαλείται από gram-αρνητικούς βακίλλους της *Bordetella pertussis*. Εμφανίζεται κατά κανόνα στα παιδιά με παροξυσμικούς σπασμούς σοβαρού βήχα με σπαστικές εισπνοές και εμετό μετά το βήχα, που παραμένει για πολλές εβδομάδες.

Το αποτέλεσμα της νόσου είναι υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, ιδιαίτερα στα παιδιά.

Ο κοκκύτης είναι μια ενδημική νόσος, ωστόσο εμφανίζονται επιδημίες κάθε 3 – 5 χρόνια. Στις Η.Π.Α. αναφέρονται κάθε χρόνο 5000 – 7000 περιπτώσεις. Η εμφάνιση του κοκκύτη έχει μειωθεί κατά πολύ με τους μαζικούς εμβολιασμούς. Ωστόσο, η νόσος επανεμφανίζεται, ακόμα και σε χώρες με υψηλή κάλυψη εμβολιασμών⁽¹⁾. Παγκοσμίως, γίνεται διάγνωση 50 εκατομμυρίων περιπτώσεων κοκκύτη κατ' έτος και περίπου 350.000 άνθρωποι πεθαίνουν από τη νόσο⁽²⁾. Η εμφάνιση του κοκκύτη παρουσιάζει σταθερή αύξηση από το 1980⁽³⁾. Η ανοσία που προκαλείται με το εμβόλιο φθίνει μετά από 5 έως 10 χρόνια, καθιστώντας τον εμβολιασμένο ξενιστή ευάλωτο στη λοίμωξη. Η λοίμωξη σε εμβολιασμένα άτομα προκαλεί πιο ήπια, μη ειδική νόσο, χωρίς τα κλασικά κλινικά στάδια. Βήχας με σπαστικές εισπνοές παρατηρείται μόνον στο 6% αυτών των περιπτώσεων. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις η νόσος χαρακτηρίζεται από μη ειδικό, παρατεταμένο βήχα, που διαρκεί από αρκετές εβδομάδες έως μήνες. Λόγω αυτών των άτυπων συμπτωμάτων, ο κοκκύτης συχνά δεν διαγιγνώσκεται σε εφήβους και ενήλικους, οι οποίοι ενδέχεται να γίνουν ξενιστές, που μπορεί να μεταδώσουν το μικρόβιο σε μη εμβολιασμένα νήπια⁽⁴⁾. Παιδιά πολύ μικρά για πλήρη εμβολιασμό και εκείνα που δεν έχουν ολοκληρώσει ακόμα τη βασική σειρά εμβολιασμού είναι σε μεγαλύτερο κίνδυνο για σοβαρή νόσο. Η νόσος είναι εξαιρετικά μεταδοτική και ποσοστό μέχρι και 90% των ευάλωτων ατόμων μέσα στην οικογένεια αναπτύσσουν την κλινική νόσο μετά από έκθεση στο μικρόβιο.

Η έγκαιρη αντιμικροβιακή θεραπεία μειώνει τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων και περιορίζει την περίοδο μεταδοτικότητας. Η άμεση ταυτοποίηση των περιπτώσεων μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της λοίμωξης μη εμβολιασμένων ή ελλιπώς εμβολιασμένων ατόμων μέσω του εμβολιασμού ή αντιμικροβιακής προφύλαξης. Η εργαστηριακή διάγνωση του κοκκύτη μπορεί να γίνει είτε άμεσα μέσω καλλιέργειας, DFA ή PCR είτε με έμμεσες ορολογικές εξετάσεις. Επειδή τα βακτήρια παραμένουν στην ανώτερα αναπνευστική οδό τις πρώτες δύο εβδομάδες της λοίμωξης, αυτή μπορεί να ανιχνευτεί με άμεσες μεθόδους μόνον κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης περιόδου. Το δείγμα εκλογής για την άμεση ανίχνευση είναι ρινοφαρυγγικό (με χρήση αναρρόφησης ή στυλεού). Οι ορολογικές εξετάσεις βοηθούν τόσο στη διάγνωση άτυπων λοιμώξεων με παρατεταμένο βήχα όσο και για επιδημιολογικούς σκοπούς. Αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων έναντι της Τοξίνης του Κοκκύτη (PT) και της Νηματοδούς Αιμοσυγκολλητίνης (FHA) θεωρούνται ως ευαίσθητοι ορολογικοί δείκτες για τη διάγνωση του κοκκύτη σε ενήλικους και μη εμβολιασμένα παιδιά⁽⁵⁾. Σε μη εμβολιασμένα παιδιά, αυξήσεις των επιπέδων των αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης G (IgG) ή των αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης A (IgA) σε ένα μόνο ή σε διάφορα αντιγόνα απαιτούνται για να πληρείται ο ορισμός της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) για τον κοκκύτη. Σε εμβολιασμένα παιδιά, ένα και μόνο δείγμα ορού ενδέχεται να είναι επαρκές για τη διάγνωση του κοκκύτη⁽⁶⁾.

Οι προσδιορισμοί SeroPertussis™ IgG και SeroPertussis™ IgA/IgM χρησιμοποιούν εμπλουτισμένο κλάσμα PT και FHA ως αντιγόνα, επιτρέποντας ευαίσθητη ανίχνευση αντισωμάτων IgA ή/και IgM και ημιποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG έναντι της *Bordetella pertussis*, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα για παρακολούθηση της ανοσολογικής κατάστασης και της κινητικής των αντισωμάτων.

Αρχή της εξέτασης

- Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης SeroPertussis™ είναι επιστρωμένες με εμπλουτισμένο κλάσμα τοξίνης και νηματώδους αιμοσυγκολλητίνης της *Bordetella pertussis*.
- Ο προς εξέταση ορός αραιώνεται σε αναλογία 1/100 και επωάζεται στην πλάκα SeroPertussis™. Στο βήμα αυτό, ειδικά αντισώματα έναντι της *B. pertussis* δεσμεύονται στα ακινητοποιημένα αντιγόνα.
- Τα μη ειδικά αντισώματα αφαιρούνται με έκπλυση.
- Προστίθεται αντι-ανθρώπινη IgG συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Στο βήμα αυτό, το συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης δεσμεύεται στο ήδη δεσμευμένο σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος.
- Το μη δεσμευμένο αντιδραστήριο σύζευξης αφαιρείται με έκπλυση.
- Προστίθεται υπόστρωμα TMB και υδρολύεται από την υπεροξειδάση, δίνοντας κυανό διάλυμα του ανηγμένου υποστρώματος.
- Μόλις προστεθεί το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης, το κυανό χρώμα γίνεται κίτρινο και η απορρόφηση θα πρέπει να διαβαστεί με φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 450/620 nm.
- Η απορρόφηση είναι ανάλογη προς την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που έχουν δεσμευτεί στα επιστρωμένα αντιγόνα.

Διαδικασία προσδιορισμού

Προσθέστε 50 μl από κάθε έτοιμο προς χρήση βαθμονομητή (P10, P50, P75), και 50μl από τα αραιωμένα σε αναλογία 1/100 αρνητικό ορό ελέγχου, θετικό ορό ελέγχου και τα δείγματα στα βυθίσματα της πλάκας μικροτιτλοδότησης που είναι επιστρωμένα με ειδικές ανοσοεπικρατούσες πρωτεΐνες της *B. pertussis*.

↓
Καλύψτε την πλάκα και επώαστε επί 1 ώρα στους 37° C σε υγρασία 100%

↓
Εκπλύνετε 3 φορές με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα

↓
Προσθέστε 50 μl από το αραιωμένο σε αναλογία 1/300 και συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης

↓
Καλύψτε την πλάκα και επώαστε επί 1 ώρα στους 37° C σε υγρασία 100%

↓
Εκπλύνετε 3 φορές με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα

↓
Προσθέστε 100 μl από το υπόστρωμα TMB
↓
Καλύψτε την πλάκα και επώαστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
↓
Προσθέστε 100 μl διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης
↓
Διαβάστε την απορρόφηση στα 450/620 nm
↓
Υπολογίστε και ερμηνεύστε τα αποτελέσματα

Περιεχόμενα του διαγνωστικού συνόλου

Διαγνωστικό σύνολο για 96 προσδιορισμούς

Αρ. κατ. A231-01

1. **Πλάκα μικροτιτλοδότησης επιστρωμένη με αντιγόνο *B. pertussis***: 96 αποσπώμενα βυθίσματα (8x12) επιστρωμένα με αντιγόνα της *B. pertussis*, σε συσκευασία από αλουμίνιο που περιέχει ξηραντικό.

1 πλάκα

2. **Συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα (20X)**: Ρυθμιστικό διάλυμα PBS - Tween. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.

1 φιάλη, 100 ml

3. **Αραιωτικό ορού-RT**: Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.

1 φιάλη, 30 ml

4. **Αραιωτικό αντιδραστήριου σύζευξης**: Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.

1 φιάλη, 40 ml

5. **Αρνητικός ορός ελέγχου (100X)**: Ανθρώπινος ορός IgG αρνητικός για *B. Pertussis* IgG έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2 ml

6. **Θετικός ορός ελέγχου (100X)**: Ανθρώπινος ορός IgG θετικός για *B. pertussis* Ig έτοιμος για χρήση G. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2 ml

7. **Βαθμονομητής P10**: Βαθμονομητής έτοιμος για χρήση, που περιέχει 10 BU/ml (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης) ανθρώπινων ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι της *B. pertussis*. Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2 ml

8. **Βαθμονομητής P50**: Βαθμονομητής έτοιμος για χρήση, που περιέχει 50 BU/ml (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης) ανθρώπινων ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι της *B. pertussis*. Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου

και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2 ml

9. **Βαθμονομητής P75:** Βαθμονομητής έτοιμος για χρήση, που περιέχει 75 BU/ml (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης) ανθρώπινων ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι της *B. pertussis*. Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2 ml

10. **Αντιδραστήριο σύζευξης, συζευγμένο με HRP (300X):** Αντι-ανθρώπινη IgG (ειδική για τη γάμμα αλυσίδα) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.

1 φιαλίδιο, 0,2 ml

11. **Υπόστρωμα TMB:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 3, 3', 5, 5' - τετραμεθυλοβενζιδίνη ως χρωμογόνο και υπεροξειδίο ως υπόστρωμα.

1 φιάλη, 14 ml

12. **Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 1M H₂SO₄.

1 φιάλη, 15 ml

13. **Κάλυμμα πλάκας:**

1 τεμάχιο

14. **Φυλλάδιο οδηγιών:**

1

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες για την αραίωση των ορών των ασθενών.
2. Πλαστικό φιαλίδιο μίας χρήσης για την αραίωση του συμπυκνωμένου, συζευγμένου με HRP αντιδραστήριου σύζευξης.
3. Μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου και πολυκάναλες πιπέτες (εύρος όγκων σε μικρολίτρα 5-50, 50-200 και 200-1000μl) και ρύγχη μίας χρήσης.
4. Μία ογκομετρική φιάλη ενός λίτρου.
5. Ένας ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml.
6. Φιάλη έκπλυσης.
7. Απορροφητικό χαρτί.
8. Αναμείκτης στροβιλισμού (vortex).
9. Υδατόλουτρο 37° C με καπάκι ή υγραντικός θάλαμος τοποθετημένος μέσα σε επωαστήρα 37° C.
10. Φωτόμετρο ELISA με φίλτρο 450 και 620 nm.
11. Απεσταγμένο ή διπλά απιονισμένο νερό.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για *In Vitro* διαγνωστική χρήση

1. Το παρόν διαγνωστικό σύνολο περιλαμβάνει ανθρώπινους ορούς, οι οποίοι έχουν εξεταστεί με τεχνικές εγκεκριμένες από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) και βρέθηκαν αρνητικοί για HBsAg και για αντισώματα έναντι των HCV και HIV. Ωστόσο, επειδή καμία γνωστή μέθοδος δεν μπορεί να διασφαλίσει πλήρως ότι προϊόντα που παράγονται από ανθρώπινο αίμα δεν μεταδίδουν λοίμωξη, ο χειρισμός όλων των συστατικών ανθρώπινου αίματος που

παρέχονται με αυτό το διαγνωστικό σύνολο θα πρέπει να γίνεται σαν να επρόκειτο για δυνητικώς μολυσματικό ορό ή αίμα, σύμφωνα με τις συστάσεις που δημοσιεύθηκαν στο εγχειρίδιο του CDC/NIH υπό τον τίτλο "Βιολογική ασφάλεια σε Μικροβιολογικά και Βιοϊατρικά Εργαστήρια" (Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories), 1988.

2. Το διάλυμα του υποστρώματος TMB είναι υλικό που ερεθίζει το δέρμα και τους βλεννογόνους. Αποφύγετε την άμεση επαφή.
3. Όλα τα συστατικά αυτού του διαγνωστικού συνόλου έχουν βαθμονομηθεί και εξεταστεί ανά παρτίδα. Δεν συνιστάται η ανάμειξη συστατικών από διαφορετικές παρτίδες διότι αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.
4. Το αραιωμένο θειικό οξύ (1M H₂SO₄) είναι παράγοντας που ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα. Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και συμβουλευθείτε γιατρό.

Φύλαξη και διάρκεια ζωής των αντιδραστηρίων

1. Όλα τα παρεχόμενα υλικά πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C. Τα μη ανοιγμένα φιαλίδια αντιδραστηρίων παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του διαγνωστικού συνόλου. Η έκθεση των ανέγγιχτων πωματισμένων ή σφραγισμένων συστατικών του διαγνωστικού συνόλου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί λίγες ώρες δεν θα προκαλέσει βλάβη στα αντιδραστήρια. **ΜΗΝ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ!**
2. Μόλις ανοιχθεί το διαγνωστικό σύνολο, η διάρκεια ζωής του είναι 90 ημέρες.
3. Οι μη χρησιμοποιημένες σειρές μικροπιπλοδότησης πρέπει να σφραγίζονται εκ νέου μέσα στη συσκευασία από αλουμίνιο με το ξηραντικό, γυρίζοντας καλά το ανοιχτό άκρο και σφραγίζοντας ερμητικά με ταινία κατά μήκος του ανοίγματος.
4. Ενδέχεται να αναπτυχθούν κρύσταλλοι στο 20x συμπυκνωμένο πλυτικό ρυθμιστικό διάλυμα κατά τη διάρκεια της φύλαξης στο ψυγείο. Αυτό είναι απολύτως φυσιολογικό. Αναδιαλύστε τους κρυστάλλους θερμαίνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα στους 37° C πριν την αραίωση. Μόλις αραιωθεί, το διάλυμα μπορεί να φυλαχτεί στους 2-8° C μέχρι είκοσι μία ημέρες.

Συλλογή ορών

Προετοιμάστε τους ορούς από δείγματα που συλλέχθηκαν με ασηπτική διαδικασία χρησιμοποιώντας τις συνήθεις τεχνικές. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται οροί που αδραντοποιήθηκαν με θερμότητα. Η χρήση λιπαιμικών, θολών ή μολυσμένων ορών δε συνιστάται. Σωματίδια και ίζηματα στον ορό ενδέχεται να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τέτοια δείγματα θα

πρέπει να διαυγάζονται μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης πριν από την εξέταση.

Φύλαξη δειγμάτων

Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C και να εξετάζονται εντός 7 ημερών (συνιστάται ιδιαίτερα η προσθήκη αζιδίου του νατρίου 0,1%). Αν αναμένεται μεγαλύτερη περίοδος φύλαξης, χωρίστε σε κλάσματα και φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία μικρότερη των -20° C. Αποφύγετε την επανειλημμένη απόψυξη και κατάψυξη.

Διαδικασία εξέτασης

A. Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

1. Φέρετε όλα τα συστατικά και τα προς εξέταση κλινικά δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμείξτε απαλά τους βαθμονομητές (P10, P50, P75), τον αρνητικό ορό ελέγχου, το θετικό ορό ελέγχου και τα κλινικά δείγματα πριν από τη χρήση.
2. Καθορίστε το συνολικό αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων. Εκτός από τα δείγματα, σε κάθε εξέταση πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής: Τρία βυθίσματα για τους βαθμονομητές (P10, P50, P75), ένα βύθισμα για τον αρνητικό ορό ελέγχου και ένα βύθισμα για το θετικό ορό ελέγχου.
3. Αφαιρέστε την πλάκα μικροπιλοδότησης από την αλουμινένια συσκευασία της κόβοντας το ένα άκρο κοντά στο σημείο του σφραγίσματος. Αφήστε τον απαιτούμενο αριθμό σειρών μικροπιλοδότησης (ανάλογα με τον αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων) στο πλαίσιο των 96 βυθισμάτων.
Οι μη χρησιμοποιημένες σειρές μικροπιλοδότησης πρέπει να σφραγίζονται εκ νέου μέσα στη συσκευασία από αλουμίνιο με το ξηραντικό, γυρίζοντας καλά το ανοιχτό άκρο και σφραγίζοντας ερμητικά με ταινία κατά μήκος του ανοίγματος.
4. Αραιώστε το συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1/20 με διπλά απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Για παράδειγμα, προκειμένου να ετοιμάσετε ένα λίτρο πλυστικού ρυθμιστικού διαλύματος, προσθέστε 50 ml συμπυκνωμένου πλυστικού ρυθμιστικού διαλύματος σε 950 ml διπλά απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού.

B. Επώαση των δειγμάτων ορών και των ορών ελέγχου

5. Αραιώστε κάθε ορό ασθενούς σε αναλογία 1/100 με το παρεχόμενο αραιωτικό ορού-RT ως εξής: Προσθέστε 10 μl από τον ορό του ασθενούς σε 190 μl αραιωτικού ορού-RT (1/20) και κατόπιν αραιώστε κι άλλο προσθέτοντας 25 μl από την αραιώση 1/20 σε 100 μl αραιωτικού ορού-RT.
6. Διανείμετε 50 μl από καθέναν από τους τρεις βαθμονομητές (P10, P50, P75) και από τους αρνητικούς και θετικούς ορούς ελέγχου και τα δείγματα ορού σε ξεχωριστά βυθίσματα της σειράς μικροπιλοδότησης.

7. Καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επώαστε επί 1 ώρα σε 37° C μέσα σε υγραντικό θάλαμο.

8. Απορρίψτε το υγρό περιεχόμενο των βυθισμάτων.

9. Βήμα έκπλυσης:

Μη αυτόματη έκπλυση:

Γεμίστε κάθε βύθισμα με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι το στόμιο του βυθίσματος και απορρίψτε το υγρό, επαναλάβετε αυτό το βήμα δύο φορές επί συνόλου τριών βημάτων έκπλυσης.

Αυτοματοποιημένη έκπλυση:

Γεμίστε κάθε βύθισμα με 350 μl πλυστικού ρυθμιστικού διαλύματος και απορρίψτε το υγρό, επαναλάβετε αυτό το βήμα δύο φορές επί συνόλου τριών βημάτων έκπλυσης.

10. Στεγνώστε τις σειρές μικροπιλοδότησης και το πλαίσιο χτυπώντας τα απαλά πάνω σε καθαρό απορροφητικό χαρτί.

Γ. Επώαση με το αντιδραστήριο σύζευξης

11. Το συμπυκνωμένο αντιδραστήριο αντι-ανθρώπινης IgG συζευγμένο με HRP πρέπει να αραιώνεται σε διάλυμα εργασίας ακριβώς πριν από τη χρήση. Αραιώστε τη συμπυκνωμένη, συζευγμένη με HRP αντι-ανθρώπινη IgG σε αναλογία 1/300 με το αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης. Για παράδειγμα: Για δύο σειρές, προετοιμάστε τουλάχιστον 3 ml από το αντιδραστήριο σύζευξης ως εξής: 10 μl από το συμπυκνωμένο, συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο αντι-ανθρώπινης IgG αναμειγνύεται με 3 ml από το αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης.
12. Διανείμετε 50 μl από το αραιωμένο συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης σε κάθε βύθισμα.
13. Καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επώαστε επί 1 ώρα σε 37° C μέσα σε υγραντικό θάλαμο.
14. Απορρίψτε το υγρό περιεχόμενο και πλύνετε όπως περιγράφεται στα βήματα 9-10.

Δ. Επώαση με υπόστρωμα TMB

15. Διανείμετε 100 μl από το υπόστρωμα TMB σε κάθε βύθισμα, καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου επί **15 Λεπτά**.
16. Τερματίστε την αντίδραση προσθέτοντας 100μl από το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (1M H₂SO₄) σε κάθε βύθισμα.

Ε. Προσδιορισμός των αποτελεσμάτων

17. Προσδιορίστε την απορρόφηση στα 450/620 nm και καταγράψτε τα αποτελέσματα. Ο προσδιορισμός θα πρέπει να γίνει μέσα σε 30 λεπτά από τον τερματισμό της χρωμογόνου αντίδρασης.

- **Σημείωση:** Τυχόν φυσαλίδες αέρα θα πρέπει να αφαιρούνται πριν την ανάγνωση. Ο πυθμένας της μικροπλάκας ELISA πρέπει να καθαρίζεται προσεκτικά.

Επικύρωση της εξέτασης

Για να είναι έγκυρη η εξέταση, πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια. Αν δεν πληρούνται αυτά τα κριτήρια, η εξέταση θα πρέπει να θεωρείται άκυρη και να επαναλαμβάνεται.

1. P75: OD $\geq 1,0$
2. Ο λόγος OD P50 / OD P10 είναι $>1,6$
3. Ο λόγος OD P75 / OD P10 είναι $>2,2$
4. Αρνητικός ορός ελέγχου: $<10\text{BU/ml}$ (Ανατρέξτε στο κεφάλαιο – Υπολογισμός και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της εξέτασης)
5. Θετικός ορός ελέγχου: $\geq 30\text{BU/ml}$ (Ανατρέξτε στο κεφάλαιο – Υπολογισμός των αποτελεσμάτων της εξέτασης)

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων της εξέτασης

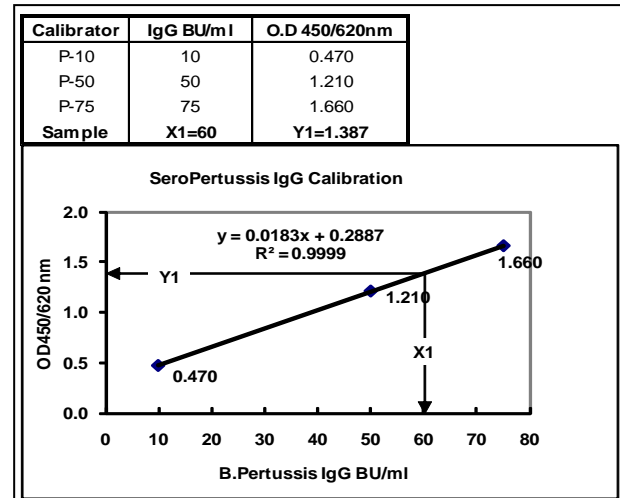
Μέθοδος με το χέρι, χρησιμοποιώντας τετραγωνισμένο χαρτί γραφημάτων (χαρτί μιλιμετρέ):

1. Αποτυπώστε γραφικά τις τιμές απορρόφησης (OD) των τριών βαθμονομητών (P10, P50 και P75) στον άξονα των Y ως προς τη συγκέντρωσή τους (BU/ml) στον άξονα των X.
2. Σχεδιάστε την καλύτερα προσαρμοσμένη γραμμική καμπύλη που διέρχεται από τα σημεία.
3. Χρησιμοποιώντας την τυπική καμπύλη, υπολογίστε τη συγκέντρωση του θετικού ορού ελέγχου και του αρνητικού ορού ελέγχου σε BU/ml.
Ο αρνητικός ορός ελέγχου θα πρέπει να είναι $<10\text{BU/ml}$
Ο θετικός ορός ελέγχου θα πρέπει να είναι: $\geq 30\text{BU/ml}$. Αν ο αρνητικός ή/και ο θετικός ορός ελέγχου δεν είναι εντός των προδιαγραφών, η εξέταση θα πρέπει να επαναλαμβάνεται.
4. Χρησιμοποιώντας την τυπική καμπύλη, υπολογίστε τη συγκέντρωση των εξετασθέντων δειγμάτων (σε BU/ml) από κάθε απορρόφηση που μετρήθηκε (δείτε το παράδειγμα 1).

Παράδειγμα 1. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Στον άξονα των Y διαβάστε την τιμή απορρόφησης του δείγματος (Y1) και τραβήξτε μια οριζόντια γραμμή μέχρι την καμπύλη βαθμονόμησης.

Από το σημείο τομής (X1), τραβήξτε μια κάθετη γραμμή στον άξονα των X. Διαβάστε τη συγκέντρωση του δείγματος σε BU/ml.



Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

IgG BU/ml	Αποτέλεσμα	Ερμηνεία
$< 10\text{BU/ml}$	Αρνητικό Δεν είναι ανιχνεύσιμα αντισώματα IgG	Καμία ένδειξη λοίμωξης από <i>B. pertussis</i> (ανατρέξτε στην ενότητα Περιορισμοί της εξέτασης)
$\geq 10\text{BU/ml}$ $< 50\text{BU/ml}$	Θετικό Ανιχνεύσιμα επίπεδα αντισωμάτων IgG	Ένδειξη πρόσφατης ή παρελθούσας λοίμωξης¹ ή ανοσοποίησης έναντι της <i>B. pertussis</i>
$\geq 50\text{BU/ml}$	Υψηλά θετικό Υψηλά επίπεδα αντισωμάτων IgG	Ένδειξη πρόσφατης ή τρέχουσας λοίμωξης από <i>B. pertussis</i>

¹ Προκειμένου να γίνει διαφοροποίηση μεταξύ παρελθούσας ή τρέχουσας λοίμωξης, συνιστάται να λάβετε δεύτερο δείγμα μετά από 2-4 εβδομάδες. Αν η τιμή σε BU/ml του δεύτερου δείγματος αυξηθεί κατά πολύ, υπάρχει ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης.

Προκειμένου να αξιολογήσετε αν είναι σημαντική η διαφορά ανάμεσα στις δύο μετρήσεις, ο λόγος μεταξύ των ορών πρέπει να υπολογιστεί ως εξής:

$$R = \frac{\text{BU2} + 15}{\text{BU1} + 15}$$

BU1 = Συγκέντρωση του πρώτου δείγματος σε BU/ml

BU2 = Συγκέντρωση του δεύτερου δείγματος σε BU/ml

Αν $R \geq 1,7$, η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,005$). Η εξίσωση αυτή δεν ισχύει όταν και τα δύο δείγματα είναι μικρότερα από 10 BU/ml. Αν ένα από τα δείγματα έχει τιμή μικρότερη από -13 BU/ml, τότε θα πρέπει να γίνει εισαγωγή 1 BU/ml για να επιτευχθούν πλήρη αποτελέσματα με τον τελικό υπολογισμό.

Προκειμένου να ληφθεί ένα πλήρες προφίλ των αντισωμάτων, θα πρέπει να γίνει και εξέταση και για IgM και για IgA.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση το συνδυασμό της ανίχνευσης αντισωμάτων IgG, IgA και IgM.

Bordetella Pertussis			
IgG	IgA	IgM	
Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Καμία ένδειξη λοίμωξης από <i>B. pertussis</i> (ανατρέξτε στην ενότητα Περιορισμοί της εξέτασης)
Αρνητικό ή Θετικό	Αρνητικό ή Θετικό	Θετικό	Ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης
Θετικό	Αρνητικό ή Θετικό	Αρνητικό	Ένδειξη παρελθούσας ή τρέχουσας λοίμωξης
Αρνητικό ή Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης.

Περιορισμοί της εξέτασης

1. Για την τελική διάγνωση δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία μόνον ορολογική εξέταση. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα κλινικά και τα εργαστηριακά δεδομένα.
2. Δείγματα που λαμβάνονται σε πολύ αρχικό στάδιο πρωτογενούς λοίμωξης ενδέχεται να μην περιέχουν ανιχνεύσιμα αντισώματα. Αν υπάρχει υποψία για λοίμωξη από *B. pertussis*, πρέπει να ληφθεί δεύτερο δείγμα 2-4 εβδομάδες αργότερα και να εξετασθεί παράλληλα με το αρχικό δείγμα.
3. Όταν υπάρχει υποψία λοίμωξης σε βρέφη μικρότερα των 6 μηνών, θα πρέπει να εκτελεστεί άλλη εξέταση (καλλιέργεια, PCR) επειδή παιδιά μικρότερα των 6 μηνών σπανίως αναπτύσσουν αντισώματα.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Ακρίβεια

Ακρίβεια εντός του ίδιου προσδιορισμού (στην ίδια εκτέλεση):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση Τιμή OD	Σ.Δ. %
50 BU/ml	10	48	5,2
15 BU/ml	10	15	2,5

Ακρίβεια μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (σε διαφορετικές εκτελέσεις):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση Τιμή OD	Σ.Δ. %
50 BU/ml	10	48	7
15 BU/ml	10	15	13

Βιβλιογραφία

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



**Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος για την Ευρώπη:
Obelis s.a.**

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels,

Belgium

Τηλ.: +32.2.732.59.54 Φαξ: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net