



SeroPertussis™ IgG

Dosaggio (ELISA)

Per la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi specifici IgG anti-

Bordetella Pertussis

nel siero umano

Istruzioni per l'uso

Kit per 96 determinazioni
(Codice N° A231-01)

Per uso diagnostico ***In Vitro***

Solo per uso professionale

Conservare a 2-8°C. **Non congelare**

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St.

Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Uso

Il kit SeroPertussis™ IgG è un dosaggio (ELISA) semi-quantitativo per la determinazione degli anticorpi specifici IgG anti-*Bordetella pertussis*.

Per uso diagnostico ***In Vitro***. Solo per uso professionale.

Introduzione

La Pertosse (Pertussis) è una infezione batterica altamente contagiosa del tratto respiratorio causata da *Bordetella pertussis* – bacilli gram-negativi. Si manifesta tipicamente nei bambini con spasmi parossistici di tosse acuta, tosse convulsa e vomito post-tussivo che permane per molte settimane.

La malattia provoca un alto tasso di morbilità e mortalità, soprattutto nei bambini.

La Pertosse è una malattia endemica, ma con epidemie che si ripetono ogni 3–5 anni. Negli USA si registrano 5000–7000 casi ogni anno. Nonostante l'incidenza della Pertosse è stata notevolmente ridotta con la vaccinazione di massa, anche nei paesi con elevata copertura vaccinale, la malattia sta ricomparendo⁽¹⁾. A livello mondiale si registrano quasi 50 milioni di casi di pertosse ogni anno e circa 350,000 persone muoiono a causa della malattia⁽²⁾. L'incidenza della pertosse è aumentata costantemente dal 1980⁽³⁾. L'immunità indotta da vaccino scompare dopo 5-10 anni, rendendo il soggetto vaccinato vulnerabile

all'infezione. L'infezione nelle persone vaccinate provoca una malattia non-specifica più leggera, senza le classiche fasi cliniche. La pertosse è riscontrata solamente nel 6% di questi casi; peraltro la malattia è caratterizzata da una tosse non-specifica prolungata che dura da molte settimane a mesi. A causa di questi sintomi atipici la Pertosse è sotto diagnosticata negli adulti ed adolescenti, che possono essere i portatori dell'infezione a bambini non vaccinati⁽⁴⁾. I bambini troppo piccoli per essere vaccinati in modo completo e quelli che non hanno ancora completato la serie di vaccinazioni primarie, sono maggiormente esposti al rischio di malattia.

La malattia è altamente contagiosa e fino al 90% dei famigliari sviluppa la malattia clinica dopo l'esposizione.

Un trattamento anti-microbico precoce riduce la gravità dei sintomi e limita il periodo di contagio. Una pronta identificazione dei casi può aiutare a prevenire l'infezione delle persone non-vaccinate o sotto-vaccinate tramite vaccinazione o profilassi anti-microbica.

La diagnosi in laboratorio della Pertosse può essere diretta tramite coltura, DFA o PCR, o indiretta tramite test sierologici. Poiché i batteri risiedono nel tratto respiratorio superiore durante le prime due settimane dell'infezione, questi possono essere rilevati con metodi diretti soltanto durante questo periodo. Per il rilevamento diretto si preferisce il campione nasofaringeo (aspirazione o tampone). I test sierologici sono utili nella diagnosi d'infezioni atipiche, con tosse prolungata e per scopi epidemiologici. I livelli elevati di anticorpi anti tossina della pertosse (PT) e anti Emagglutinina Filamentosa (FHA) sono considerati marcatori sierologici sensibili nella diagnosi della Pertosse negli adulti e bambini non vaccinati⁽⁵⁾. Nei bambini non vaccinati, per rientrare nella definizione della Pertosse data dalla World Health Organization (WHO), sono necessari incrementi nei livelli delle immunoglobuline G (IgG) o A (IgA) contro un'antigene singolo o più antigeni. Nei bambini vaccinati è sufficiente un solo campione di siero per diagnosticare la Pertosse⁽⁶⁾.

SeroPertussis™ IgG e SeroPertussis™ IgA/IgM utilizzano una frazione arricchita di PT e FHA come antigeni, permettendo un rilevamento sensibile degli anticorpi IgA e/o IgM e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi IgG anti *Bordetella pertussis*, consentendo il follow-up dello stato immune e le cinetiche degli anticorpi.

Principio del Test

- Le micropiastre SeroPertussis™ sono rivestite con una frazione arricchita di tossina di *Bordetella pertussis* e Emagglutinina Filamentosa.
- Il siero da sottoporre a test è diluito 1/100 e incubato sulla piastra SeroPertussis™. In questa fase gli anticorpi specifici per *B.pertussis* si legano agli antigeni immobilizzati.
- Gli anticorpi non-specifici sono eliminati mediante lavaggio.
- Si aggiunge il coniugato anti-IgG umane marcato con perossidasi (HRP). In questa fase il coniugato HRP si lega al complesso antigene-anticorpo precedentemente formato.
- Il coniugato non legato è eliminato mediante lavaggio.
- Si aggiunge il substrato TMB che è idrolizzato dalla perossidasi, e colora di blu la soluzione di Substrato ridotto.
- Dopo l'aggiunta della soluzione di arresto il colore blu diventa giallo e si esegue la lettura con un lettore ELISA alla lunghezza d'onda di 450/620nm.

- La densità ottica è proporzionale ai livelli di anticorpi specifici legati agli antigeni fissati alla fase solida.

Procedura del test

Aggiungere 50µl di ciascun calibratore (P10, P50, P75) pronto per l'uso, e 50µl di Controllo Negativo, Controllo Positivo e campioni diluiti 1/100 ai pozzetti rivestiti con proteine specifiche immunodominanti B.pertussis

↓

Coprire ed incubare per 1 ora a 37°C a 100% di umidità

↓

Lavare 3 volte con Soluzione Tamponata di Lavaggio

↓

Aggiungere 50µl di Coniugato HRP diluito 1/300

↓

Coprire ed incubare per 1 ore a 37°C a 100% di umidità

↓

Lavare 3 volte con Soluzione Tamponata di Lavaggio

↓

Aggiungere 100µl di Substrato TMB

↓

Coprire ed incubare per 15 min. a temperatura ambiente

↓

Aggiungere 100 µl di Soluzione di Arresto

↓

Leggere a 450/620nm

↓

Calcolare ed interpretare i risultati

Materiali forniti

Kit per 96 Determinazioni
Codice N° A231-01M

- Micropiastra rivestita con antigene B. pertussis:** 96 pozzetti separabili (8x12) rivestiti con antigeni *Bordetella pertussis*, confezionati in una custodia di alluminio contenente una carta essiccante.
1 micropiastra
- Soluzione Tamponata di Lavaggio Concentrata (20X):** Tampone PBS-Tween. Contiene proclin come conservante in quantità inferiore allo 0.05%.
1 flacone, 100 ml
- Diluyente del Campione-RT:** Soluzione tamponata pronta per l'uso. Contiene proclin come conservante in quantità inferiore allo 0.05%.
1 flacone, 30 ml
- Diluyente del Coniugato:** Soluzione tamponata pronta per l'uso. Contiene proclin come conservante in quantità inferiore allo 0.05%.
1 flacone, 40 ml
- Controllo Negativo:** Siero umano negativo per IgG anti *B. pertussis*, pronto per l'uso. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2ml
- Controllo Positivo:** Siero umano positivo per IgG anti *B. pertussis*, pronto per l'uso. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2 ml

- Calibratore P10:** Calibratore pronto per l'uso contenente 10 BU/ ml (unità di legame arbitrarie) di anticorpi umani specifici IgG anti *B. pertussis*. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2 ml
- Calibratore P50:** Calibratore pronto per l'uso contenente 50 BU/ ml (unità di legame arbitrarie) di anticorpi umani specifici IgG anti *B. pertussis*. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2 ml
- Calibratore P75:** Calibratore pronto per l'uso, contenente 75 BU/ml (unità di legame arbitrarie) di anticorpi umani specifici IgG anti *B. pertussis*. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2 ml
- Coniugato HRP (300X):** Coniugato (HRP) anti IgG umane (catena γ specifiche) con perossidasi di rafano. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% come conservante.
1 fiala, 0.2 ml
- Substrato TMB:** Soluzione pronta per l'uso. Contiene 3, 3', 5, 5' - Tetrametil-benzidina come cromogeno e perossidasi come substrato.
1 flacone, 14 ml
- Soluzione di Arresto:** Soluzione pronta per l'uso. Contiene H₂SO₄ 1M.
1 flacone, 15 ml
- Coperchio:**
1 pezzo
- Istruzioni per l'uso**
1 pezzo

Materiali Richiesti ma non Forniti

- Provette pulite per la diluizione dei sieri dei pazienti.
- Fiala di plastica monouso per la diluizione del coniugato HRP concentrato.
- Micropipette regolabili e pipette multicanale (da 5-50, 50-200 e 200-1000µl) e puntali monouso.
- Un flacone volumetrico da 1 litro.
- Un cilindro volumetrico da 50ml.
- Flacone di lavaggio.
- Carta assorbente.
- Vortex
- Bagnomaria a 37°C con coperchio, o camera umida sistemata in incubatore a 37°C.
- Lettore ELISA con filtri a 450 e 620nm.
- Acqua distillata o bi-deionizzata.

Avvertenze e Precauzioni

Per Uso Diagnostico In Vitro

- Questo kit contiene sieri umani testati con tecniche approvate dalla FDA e risultati negative ai test per HBsAg e per gli anticorpi HCV e HIV. Poiché nessun test può garantire che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano infezioni, tutti i componenti da

sangue umano forniti in questo kit devono essere manipolati come potenzialmente infettivi, in conformità alle raccomandazioni pubblicate nel manuale CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988".

2. La soluzione di Substrato TMB è irritante per la pelle e le mucose. Evitare il contatto diretto.
3. Tutti i componenti del kit sono stati calibrati e testati per singolo lotto. Si sconsiglia di mescolare componenti da lotti diversi, in quanto i risultati potrebbero essere falsati.
4. L'acido solforico diluito (1M H₂SO₄) è irritante per gli occhi e la pelle. In caso di contatto con gli occhi sciacquare con acqua e consultare un medico.

Conservazione e Scadenza dei Reagenti

1. Tutti i reagenti forniti devono essere conservati a 2-8°C. Le fiale integre sono stabili sino alla data di scadenza indicata sulla confezione del kit. L'esposizione a temperatura ambiente dei componenti in confezione originale sigillata per alcune ore non è dannoso ai reagenti. **NON CONGELARE!**
2. Il kit ha una durata di 90 giorni dopo l'apertura.
3. Le strisce inutilizzate devono essere riposte nella custodia di alluminio con la carta essiccante, ripiegando il lato aperto e sigillando accuratamente con nastro su tutta la lunghezza dell'apertura.
4. Durante la conservazione a freddo la formazione di cristalli nella Soluzione Tamponata di Lavaggio concentrata 20x è del tutto normale. Sciogliere i cristalli portando la soluzione a 37°C prima di diluire. Dopo la diluizione la soluzione può essere conservata fino a 21 giorni a 2-8°C.

Raccolta dei Sieri

Preparare i sieri da campioni aseptici raccolti con tecniche standard. Non utilizzare sieri inattivati con trattamento termico. Si sconsiglia l'uso di sieri lipemici, torbidi o contaminati. Particelle e precipitati nei sieri potrebbero causare falsi risultati. Questi campioni devono essere chiarificati mediante centrifugazione o filtraggio prima di effettuare il test.

Conservazione dei Campioni

I campioni devono essere conservati a 2-8°C e utilizzati entro 7 giorni (si raccomanda l'aggiunta dello 0.1% di Sodio Azide). Nel caso si preveda la conservazione per periodi più lunghi aliquotare e conservare i campioni a -20°C. Evitare di congelare e scongelare i campioni più volte.

Procedura del Test - Manuale

Protocollo di automazione disponibile su richiesta

A. Preparazione dei Reagenti

1. Portare tutti i componenti ed i campioni clinici da testare a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i calibratori (P10, P50, P75), il Controllo Negativo, il Controllo Positivo ed i campioni clinici prima dell'uso.
2. Determinare il numero di campioni da testare. In aggiunta ai campioni includere in ogni dosaggio i seguenti componenti: tre pozzetti di calibratori (P10,

P50, P75), un pozzetto di Controllo Negativo ed un pozzetto di Controllo Positivo.

3. Estrarre la micropiastra dalla custodia di alluminio, tagliando un lato vicino al sigillo. Posizionare il numero di strisce necessarie (a seconda del numero di campioni da testare) nel supporto da 96 pozzetti. Le strisce inutilizzate devono essere riposte nella custodia di alluminio con la carta essiccante ripiegando il lato aperto e risigillando accuratamente con nastro su tutta la lunghezza dell'apertura.
4. Diluire 1/20 la Soluzione Tamponata di Lavaggio Concentrata con acqua bi-deionizzata o distillata. Ad esempio, per preparare un litro di soluzione tamponata di lavaggio aggiungere 50ml della Soluzione Tamponata di Lavaggio concentrata a 950 ml di acqua bi-deionizzata o distillata.

B. Incubazione dei campioni e dei controlli

5. Diluire ogni campione di siero del paziente 1/100 con il Diluente del Campione-RT fornito come segue: Aggiungere 10 µl di siero del paziente a 190µl di Diluente del Campione-RT (1/20), e poi diluire ulteriormente aggiungendo 25µl della soluzione diluita 1/20 a 100µl del Diluente del Campione-RT.
6. Dispensare 50µl di ciascun dei tre calibratori (P10, P50, P75), 50 µl dei controlli negativo e positivo e dei campioni diluiti in pozzetti separati della piastra.
7. Coprire le strisce con il coperchio ed incubare per 1 ora a 37°C in una camera umida.
8. Eliminare il contenuto liquido dei pozzetti.
9. **Lavaggi:**

Lavaggio Manuale:

Riempire ciascun pozzetto fino al bordo con la soluzione tamponata di lavaggio ed eliminare il liquido. Ripetere altre due volte per un totale di tre lavaggi.

Lavaggio Automatico:

Riempire ciascun pozzetto con 350µl di soluzione tamponata di lavaggio ed eliminare il liquido. Ripetere altre due volte per un totale di tre lavaggi.

10. Asciugare le strisce ed il supporto battendo delicatamente su carta assorbente.

C. Incubazione con coniugato

11. Diluire il Coniugato HRP anti IgG umane Concentrato immediatamente prima dell'uso. Diluire 1/300 il coniugato HRP anti IgG umane concentrato con il Diluente del Coniugato. Ad esempio: per due strisce preparare almeno 3 ml di coniugato come segue: 10 µl di Coniugato HRP anti IgG umane concentrato mescolato con 3ml di Diluente del Coniugato.
12. Dispensare 50µl di Coniugato HRP diluito in ciascun pozzetto.
13. Coprire le strisce con il coperchio ed incubare per 1 ora a 37°C in una camera umida.
14. Eliminare il liquido contenuto e lavare come descritto ai precedenti punti 9-10.

D. Incubazione con il Substrato TMB

15. Dispensare 100µl di Substrato TMB in ciascun pozzetto, coprire con il coperchio ed incubare a temperatura ambiente per **15 minuti**.
16. Arrestare la reazione aggiungendo 100µl di Soluzione di Arresto (1M H₂SO₄) in ciascun pozzetto.

E. Determinazione dei Risultati

17. Determinare le densità ottiche a 450/620nm e registrare i risultati. La determinazione non deve superare i 30 minuti dall'arresto della reazione cromogena.

- **Nota:** Eliminare eventuali bolle d'aria prima di effettuare la lettura. Pulire accuratamente il fondo della piastra ELISA.

Validazione del Test

E' necessario rispettare i criteri sottoelencati al fine considerare il test valido. Se questi criteri non vengono rispettati il test deve essere considerato non valido e deve essere ripetuto.

1. P75: DO ≥ 1.0
2. Il rapporto DO P50 / DO P10 è > 1.6
3. Il rapporto DO P75 / DO P10 è > 2.2
4. Controllo Negativo: $< 10 \text{ BU/ml}$ (Vedi capitolo – Calcolo ed Interpretazione dei Risultati del Test)
5. Controllo Positivo: $\geq 30 \text{ BU/ml}$ (Vedi capitolo – Calcolo dei Risultati del Test)

Calcolo dei Risultati del Test

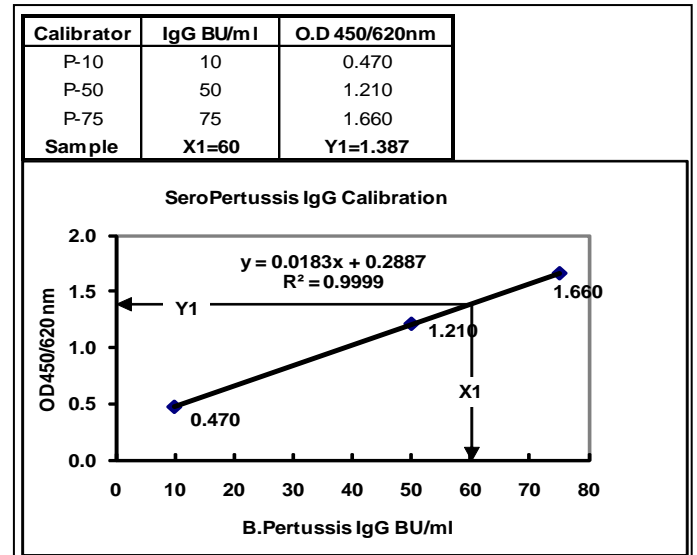
Metodo Manuale, mediante carta millimetrata:

1. Segnare le densità ottiche (DO) dei tre calibratori (P10, P50 e P100) sull'asse Y e la loro concentrazione (BU/ml) sull'asse X.
2. Disegnare la curva lineare che meglio si adatta ai punti standard.
3. Interpolare la concentrazione del Controllo Positivo e Controllo Negativo in BU/ml mediante la curva standard. Il Controllo Negativo deve essere $< 10 \text{ BU/ml}$ Il Controllo Positivo deve essere: $\geq 30 \text{ BU/ml}$. Se il Controllo Negativo e/o Controllo Positivo non sono entro i limiti il test deve essere ripetuto.
4. Utilizzando la curva standard, interpolare la concentrazione dei valori dei campioni (in BU/ml) da ciascuna densità ottica letta (vedi esempio 1).

Esempio 1. Interpolazione dei risultati:

Leggere la densità ottica del campione (Y1) sull'asse Y e disegnare una riga orizzontale sino alla curva di calibrazione.

Dal punto di intercettazione (X1), disegnare una linea verticale sino all'asse X. Leggere la concentrazione del campione in BU/ml.



Interpretazione dei Risultati

IgG BU/ml	Risultato	Interpretazione
$< 10 \text{ BU/ml}$	Negativo Anticorpi IgG non rilevati	Nessuna indicazione di infezione da <i>B.pertussis</i> (vedi Limiti del Test)
$\geq 10 \text{ BU/ml}$ $< 50 \text{ BU/ml}$	Positivo Livelli di anticorpi IgG rilevabili	Indicazione di infezione passata, recente¹ o immunizzazione contro <i>B.pertussis</i>
$\geq 50 \text{ BU/ml}$	Altamente Positivo Elevato livello di anticorpi IgG	Indicazione di infezione <i>B.pertussis</i> recente o in atto

- 1 Per differenziare tra infezione passata e in atto si consiglia di prelevare un secondo campione dopo 2-4 settimane. Se il valore BU/ml del secondo campione aumenta significativamente è indice di infezione in atto.

Per valutare se la differenza tra i due valori è significativa si deve calcolare il rapporto tra i sieri come segue:

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

BU1 = Concentrazione in BU/ml del 1° campione

BU2 = Concentrazione in BU/ml del 2° campione

Se $R \geq 1.7$, la differenza è statisticamente significativa ($p=0.005$). Questa equazione non è valida quando entrambi i campioni hanno un valore inferiore a 10 BU/ml. Se uno dei campioni ha un valore inferiore a -13 BU/ml si deve introdurre 1 BU/ml per il calcolo finale per ottenere risultati complessivi.

Per ottenere un profilo complessivo degli anticorpi si deve effettuare il test anche per IgM e IgA.

Interpretazione dei risultati in base al rilevamento di anticorpi IgM, IgA e IgG.

Bordetella Pertussis			
IgG	IgM	IgA	
Negativo	Negativo	Negativo	Nessuna indicazione di infezione da <i>B.pertussis</i> (vedi Limiti del Test)
Negativo o Positivo	Positivo	Negativo o Positivo	Indicazione di infezione in atto
Positivo o negativo	Negativo	Positivo	Indicazione di infezione recente
Positivo	Negativo	Negativo o positivo	Indicazione di infezione recente, passata o immunità acquisita.

Bibliografia

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

Limiti del Test

1. La diagnosi finale non deve basarsi solo sul test sierologico. E' necessario prendere in considerazione tutti i dati clinici e di laboratorio.
2. Campioni prelevati troppo presto durante l'infezione primaria possono non contenere anticorpi rilevabili. Nel caso di sospetta *B.pertussis* si deve prelevare un secondo campione dopo 2-4 settimane e testare in parallelo con il campione originale.
3. Nel caso di sospetta infezione in bambini sotto i sei mesi di età si deve eseguire un test diverso (coltura, PCR) poiché questi soggetti sviluppano raramente anticorpi.

Caratteristiche

Precisione

Precisione intra-saggio:

Campione	N° di Repliche	Valore DO medio	CV%
50BU/ml	10	48	5.2
15BU/ml	10	15	2.5

Precisione inter-saggio:

Campione	N° di Repliche	Valore DO medio	CV%
50BU/ml	10	48	7
15BU/ml	10	15	13



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

	Limite di temperatura
	Consultare le istruzioni prima dell'uso
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Produttore
	Rappresentante europeo autorizzato