

**VIROTECH Bordetella pertussis (FHA+PT) IgG/IgA ELISA
(B. pertussis FHA+PT IgG/IgA ELISA)**

Nr zamówienia: EC115.00

Kod barwny: srebrny

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 21.3.2019

REV 13 / VIROTECH B. pertussis (FHA+PT) IgG/IgA ELISA PL

Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania IgG / IgA	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	3
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania	4
7.1 Materiały do badań	4
7.2 Przygotowanie odczynników	4
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA	5
8. Ocena wyników badania	5
8.1 Kontrola badania	5
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)	6
8.3 Schemat oceny IgG i IgA	6
8.4 Ograniczenia testu	6
9. Literatura	6
10. Schemat przebiegu badania	7

1. Cel zastosowania

Test ELISA Bordetella pertussis jest testem screeningowym. Test ELISA służy do jakościowego i pół ilościowego oznaczenia przeciwciał IgG i IgA przeciw toksynie krztuśca PT i hemaglutyninie wątkienkowej FHA w surowicy ludzkiej.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydaza) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania IgG / IgA

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 jamliwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowane
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **IgA kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
8. **IgA kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
9. **IgA kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
10. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
11. **koniugat IgA (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
12. **tetrametylobenzydyna i roztwór substratu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gotowy do użycia
13. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszkankę kwasów

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych zagrożeń pozostają pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjść tylko potrzebny do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjściowego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odżywiony, lecz należy go usunąć.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień

Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzzydina (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do pijkania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

1. Jako surowice kontrolne stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązuje odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciepłą bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
3. mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. probówki
5. chusty z masy celulozowej
6. przykrywka płytek ELISA
7. pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
8. ręczna pęczka ELISA lub automatyczna pęczka mikropłytek
9. spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
10. inkubator

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiał do badań

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz młodych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i pijkania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swoiście dla parametrów i wyłącznie z serii płytek podanych w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.

4. Koncentrat roztworu do pijkania dopełnił do 1 litra wodę destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbkę odpipetować po 100 µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (ślepa próba), kontroli negatywnej, kontroli cut-off i pozytywnej kontroli IgG i IgA oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójne oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10 µl surowicy + 1 ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne pijkanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do pijkania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do pijkania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podkładzie z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołek.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne pijkanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołek dodać pipetami po 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, a płytkę całkowicie siłą wymieszać i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620 nm (referencyjna długość fali 620-690 nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzenia.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
 2. Zaleca się również sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
 3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu.
- Takie postępowanie gwarantuje nienagane działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do półk ilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG i IgA, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągnięta jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off sŃzdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdowaŃ siŃ w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakoŖci.

JeŤeli wymagania (wartoŖci OD, VE) nie sŃspeŃnione, naleŤy powtŃrzyŃ test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby Ŗepej (450/620nm) musi byŃ odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$VE_{\text{(kontrola pozytywna)}} = \frac{OD_{\text{(kontrola pozytywna)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(surowica pacjenta)}} = \frac{OD_{\text{(surowica pacjenta)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$

8.3 Schemat oceny IgG i IgA

Wynik (VE)	Ocena
< 9,0	negatywne
9,0 - 11,0	wartoŖci graniczne
> 11,0	pozytywne

1. JeŤeli zmierzone jednostki VE próbki sŃwyŤsze od zakresu granicznego, to próbki te sŃtraktowane jako pozytywne. (uwzglŃdniŃ kalendarz szczepieŃ).
2. JeŤeli zmierzone jednostki VE znajdujŃ siŃ w podanym zakresie granicznym, nie wystŃpuje istotnie duŤe stŃŤenie przeciwiŃciŃgŃ próbki sŃtraktowane jako wartoŖci graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakaŤenia konieczne jest oznaczenie zawartoŖci przeciwiŃciŃgdwŃch próbek surowicy. Pierwsza próbka surowicy powinna byŃ zbadana bezpoŖrednio po rozpoczŃciu zakaŤenia, a druga próbka 5-10 dni pŃŤniej (surowica rekonwalescencyjna). StŃŤenie przeciwiŃciŃgŃbydwŃch próbek musi byŃ oznaczone rŃwnolegle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest moŤliwa prawidŤowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
3. JeŤeli zmierzone jednostki VE próbki sŃniŤsze od zakresu granicznego, w próbce nie wystŃpujŃ dajŃce siŃ zmierzylŃ specyficzne dla antygenŃw przeciwiŃciŃgŃ. PróbkŃ sŃtraktowane jako negatywne.
4. W przypadku pozytywnego wyniku IgG lub pozytywnego wyniku IgA zaleca siŃ potwierdzenie za pomocŃ VIROTECH Bordetella pertussis LINE Immunoblot.

8.4 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wynikŃw serologicznych powinna zawsze uwzglŃdniaŃ obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze bŃdŃce do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. W przypadku hemaglutyniny wŃŤkienkowej (FHA) chodzi o antygen grupowy, który zostaŤ znaleziony takŤe u innych czynnikŃw chorobotwŃrczych z gatunku Bordetella (np.: *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*) (5,6). W zwiŃzku z tym moŤna oczekiwaŃ reaktywnoŖci krzyŤowej.

9. Literatura

1. Wiersbitzky S. Pertussis KostengŃnstige PrŃvention zuwenig genutzt Therapiewoche 25 (1995), p.1485 - 1486
2. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, H. Brandis, W. KŃhler, H.J. Eggers, G. Pulverer, 7. Auflage, p. 483
3. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259
4. Wirsing von KŃnig et al., 1999, Evaluation of a single-Sample Serological Technique for Diagnosing Pertussis in Unvaccinated Children, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, (18)341-345
5. Elisabeth Bergfors MD et al., Parapertussis and Pertussis: Differences and Similarities in Incidence, Clinical Course, and Antibody Responses, Intern. J. Infet. Dis., 3(3):1999
6. Jacob-Dubuisson F et al., Molecular characterization of *Bordetella bronchiseptica* filamentous haemagglutinin and its secretory machinery, Microbiology (2000), 146,1211-1221

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do pękania

É **Roztwór do pękania:** Koncentrat dopełnij do 1 litra wodą destylowaną/demin.

É **Rozcieńczenie próbki IgG / IgA w stosunku 1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczania
(Roztwór do rozcieńczania surowicy jest gotowy do użycia)

Wykonanie badania

