

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

objednáací číslo : EC115.00

barevné kódování : stříbrná

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

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 CZ

Obsah

1.	Účel použití.....	3
2.	Princip testu	3
3.	Obsah soupravy IgG/ IgA.....	3
4.	Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití.....	3
5.	Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6.	Další potřebný materiál (není součástí dodávky).....	4
7.	Testování	4
7.1	Testovaný materiál	4
7.2	Připrava reagensů	4
7.3	Provedení testu ELISA VIROTECH.....	4
7.4	Použití analyzátorů ELISA	5
8.	Vyhodnocení testů	5
8.1	Kontrola funkčnosti testu	5
8.2	Výpočet jednotek VIROTECH (VE)	6
8.3	Schéma vyhodnocení IgG a IgA.....	6
8.4	Limity testu.....	6
9.	Literatura	6
10.	Schéma provedení testu (Testablaufschemata).....	7

1. Účel použití

Přesrvek Bordetella pertussis ELISA je screeningový test. Tento test Elisa slouží ke kvalitativnímu a semikvantitativnímu prokázání protilátek IgG a IgA proti PT a FHA v lidském séru.

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté.

3. Obsah soupravy IgG/ IgA

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **šedí pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **IgG negativní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgG hraniční kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgG pozitivní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgA negativní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
8. **IgA hraniční kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
9. **IgA pozitivní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
10. **IgG konjugát (anti-human), 11ml**, (ovčí nebo ostrucha kšvol' ará)-kš'en-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
11. **IgA konjugát (anti-lidský), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha kšvol' ará) s kš'enovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS ř fetální telecí sérum)
12. **Substrátový roztok tetramethylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
13. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensů je vyznačena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripty v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. L' inidla ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zšeděný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezšeděný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v souřasň dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	nezšeděný, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zšeděný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chráte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chráte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po zšedění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a sledována negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrální stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová pipeta 50µl, 100µl
3. Mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buniťiny
6. Vířka na destiláty ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývací ELISA mikrotitrální destičky
9. Mikrofotometr na mikrotitrální destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor

7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního postupu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto případě je zmíněno pouze sérum.

Zředění pacientů používejte vždy první.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení.

1. Používejte pouze první, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagentů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysokou stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k zředění a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny barvy a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně barví destičky uvedené v certifikátu kontroly kvality.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před zaplněním inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechny řidla temperována na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagenty před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentráty tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepjte).

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100µl zředěného pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgG a IgA, a naředěných sér pacienta. Doporučíme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředění sér pacienta : 1+100; např. 10µl sérum + 1ml zředěného pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destilátka se zakryje víčkem).

3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí 1-2krát promývacím roztokem 350 - 400µl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100µl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po inkubaci konjugátu následuje 1-2 násobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destičku opatrně a pečlivě protřepete poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně fialově zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl odevzát od absorbancí kontrol a vzorků. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

7.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. věžích opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA přezkontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Přezkontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za 12 měsíců.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

8. Vyhodnocení testů

Okamžitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG a IgA protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výsledky podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosažena vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

8.1 Kontrola funkčnosti testu

a) Hodnoty optické density

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15.

Hodnoty optické density negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické density uváděné v certifikátu o kontrole kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i cut off kontrol by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) cut off kontrol jsou definovány 10 VE. Výpočetné VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\begin{aligned} \text{VE pozitivní kontrola} &= \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{hraniční}} \times 10 \\ \text{VE vzorek} &= \frac{\text{OD vzorek}}{\text{hraniční}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schéma vyhodnocení IgG a IgA

Výsledek (VE)	Posouzení
< 9,0	negativní
9,0 - 11,0	hraniční hodnoty
> 11,0	pozitivní

- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní (dbejte na management olovění!).
- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí v rozmezí hraničních hodnot (šedá zóna), vzorky se berou jako hraniční. Doporučuje se tyto vzorky opakovaně testovat z nového odběru. Pro bezpečné prokázání infekce je zapotřebí určit obsah protilátek ve dvou vzorcích séra. Jeden vzorek séra by měl být podroben testu bezprostředně po začátku infekce, druhý o 5 až 10 dní později (tzv. rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být zjišťovány paralelně, tj. v jedné testovací válce. Korektní diagnóza na základě vyhodnocení výsledku testu jediného vzorku není možná.
- Pokud jsou naměřené hodnoty menší než hraničního rozmezí, nejsou ve vyšetřovaném vzorku přítomné žádné antigenspecifické protilátky. Vzorky se považují za negativní.
- Při existenci pozitivního výsledku IgG nebo IgA doporučujeme potvrzení pomocí přípravku VIROTECH Bordetella pertussis LINE Immunoblots.

8.4 Limity testu

- Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
- U filamentózního hemaglutininu (FHA) se jedná o skupinový antigen, který byl nalezen také u jiných bacilů rodu *Bordetella* (například *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*) (viz 5, 6). Lze proto očekávat křížovou reaktivitu.

9. Literatura

- Wiersbitzky S. Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt Therapiewoche 25 (1995), p.1485 - 1486
- Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, H. Brandis, W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer, 7. Auflage, p. 483
- Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259
- Wirsing von König 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
- 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
- Jacob-Dubuisson F et al., Molecular characterization of *Bordetella bronchiseptica* filamentous haemagglutinin and its secretory machinery, Microbiology (2000), 146,1211-1221

Připrava vzorků a promývacího roztoku

é **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

zředění vzorky IgG/IgA

1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

Schéma testu

