

**VIROTECH Bordetella pertussis Toxin (PT) IgM ELISA
(B. pertussis PT IgM ELISA)**

objednací číslo: EC215M00

barevné kódování : kovově modrá / průhledná

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy IgM.....	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití	3
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	3
6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)	4
7. Testování	4
7.1 Testovaný materiál.....	4
7.2 Příprava 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 IgM.....	6
8.4 Limity testu.....	6
9. Literatura.....	6
10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata)	7

1. Účel použití

Přípravek k detekci toxinu černého (dávivého) kašle ELISA prokazuje semikvantitativně a kvalitativně protilátky IgM v lidském séru. Sliouží k prokazování akutní nebo nedávno prodělané infekce.

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 IgM

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **Ředící 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. **IgM negativní kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgM hraniční kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgM pozitivní kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgM konjugát (anti-lidský), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha křivočará) s křenovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS – fetální telecí sérum)
8. **Substrátový roztok tetramethylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
9. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

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

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensií 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/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Činidla 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	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	Nezředěný, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po zředění (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 shledána negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a

mikrotitrační 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 buničiny
6. Víčka na destičky ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destiček
9. Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor

7. Testování

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

7.1 Testovaný materiál

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

Zředění pacientů používejte vždy čerstvá.

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

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

7.2 Příprava reagensů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysoký stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k ředění a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny šarže a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně s šarží destiček uvedenou v certifikátu kontroly kvality.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započetím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna činidla temperována na pokojovou teplotu .
3. Všechny tekuté reagensie před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovní roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentráty tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepejte).
5. Vysoký titr IgG nebo reumatoidní faktor mohou narušit specifický průkaz IgM protilátek a mohou vést k falešně pozitivním, resp. falešně negativním výsledkům. **Séra je třeba připravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpční prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgM odpadá předběžná adsorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100μl zředovacího pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgM, a naředěných sér pacienta. Doporučujeme 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 zředovacího pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destička se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí čtyřikrát 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 čtyřnásobné 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 žlutě zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl o odečteno od absorpance 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. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA překontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Překontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
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

Ihned použitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgM protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výkyvy podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosahována 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. Vypočtené 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.

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

8.3 Schéma vyhodnocení IgM

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

1. Protilátky IgM se netvoří vždy a jsou proto méně spolehlivým indikátorem pro existenci infekce *Bordetella pertussis* než protilátky IgG.
2. Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.
3. 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.
4. Pokud jsou naměřené hodnoty menší než hraničního rozmezí, nejsou ve vyšetřovaném vzorku přítomné žádné antigenspecifické protilátky. Vzorky se považují za negativní.
5. Při zjištěné koncentraci IgM v hraniční oblasti a výsledku IgG < 18 VE je k ověření akutní infekce zapotřebí analyzovat druhý vzorek séra.

8.4 Limity testu

1. Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.

9. Literatura

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springer-Verlag 1991, p.361 - 363
2. Wiersbitzky S. Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt Therapiewoche 25 (1995), p.1485 - 1486
3. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, H. Brandis, W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer, 7. Auflage, p. 483
4. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259
5. Mastrantonio et al., 1997, Antibody kinetics and long-term sero-prevalence in the Italian clinical trial of acellular pertussis vaccines, Dev Biol Stand., (89): 275-278
6. 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
7. De Melker, H.E. et al, Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38(2), 800-806
8. Swidsinski, S. Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, April 1997
9. Bruce D. Meade, Chrisanna M. Mink, and Charles R. Manclark. 1994. Serodiagnosis of Pertussis, Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.
10. B. Meijer, Oktober 2002, Numerical Comparison of 4 Pertussis Toxin IgG-ELISAs, nicht publiziert, Krankenhaus Groningen, NL

Příprava vzorků a promývacího roztoku

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

▼ **zředění vzorky IgM**

1:101

adsorpce revmatoidního faktoru pomocí RF-SorboTech

např.:

5 µl sérum/plazmy + 450 µl ředícího roztoku na vzorek +

1 kapka RF- SorboTech , inkubace při pokojové teplotě po dobu 15 minut

Schéma testu

inkubace vzorků



4 x promýt



inkubace
s konjugátem



4 x promýt



inkubace
se substrátem



Zastavení reakce
stop roztokem



změřit absorbanci

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C ve tmě

100 µl zředěného vzorku
100 µl kontrol

blank (ředící roztok na vzorek)

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl konjugátu
IgM

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl substrátu

50 µl stop roztoku
opatrně poklepat

mikrofotometr při
450/620nm
(Délka referenční vlny 620-690nm)