SeroPertussis™ Toxin IgG

Metoda immunoenzymatyczna (ELISA) do ilościowego oznaczania swoistych przeciwciał IgG przeciwko **toksynie *ordetella Pertussis*** surowicy ludzkiej

Instrukcja Obsługi
Zestaw testowy do 96 oznaczeń (nr katalogowy 1231-01)

Do zastosowań diagnostycznych ***in vitro***
Wyłącznie do użytku profesjonalnego
Przechowywać w temperaturze 2-8°C.
Nie zamrażać

Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St.
Ashdod
7761003

ISRAEL
Tel.: +972.8.8562920
Faks: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnostics.com

Przeznaczenie
Zestaw SeroPertussis™ Toxin IgG jest ilościowym testem immunoenzymatycznym (ELISA) do oznaczania swoistych przeciwciał IgG przeciwko toksynie *Bordetella pertussis* w surowicy lub osoczu ludzkim.

Do stosowania w diagnostyce ***in vitro***

Wprowadzenie

Krztusiec (koklusz) jest wysoce zakaźną bakteryjną infekcją dróg oddechowych, wywoływaną przez Gram-ujemne pałeczki *Bordetella pertussis*, czynnik chorobotwórczy występujący wyłącznie u ludzi, który może zaatakować osoby w każdym wieku. Do przeniesienia drobnoustroju dochodzi poprzez kropelki powietrza wytwarzane podczas kaszlu lub kichania w wyniku bezpośredniego kontaktu z osobą zakażoną. U 90% podatnych na zakażenie członków rodziny w następstwie kontaktu z chorym rozwinie się klinicznie istotna choroba. Pomimo powszechnego od kilkudziesięciu lat uodparniania dzieci, krztusiec pozostaje jedną z głównych światowych przyczyn zgonów, którym można zapobiec dzięki szczepieniom (1, 2). Najcięższy przebieg choroby występuje u niezaszczepionych niemowląt i małych dzieci, które stanowią grupę najbardziej narażoną na powikłania i zgony. Choroba ma zwykle łagodniejszy przebieg u młodzieży i dorosłych, którzy stanowią rezerwuar i są źródłem rozprzestrzeniania się choroby na małe dzieci. (3).

Epidemiologia: Krztusiec jest chorobą endemiczną, ale epidemie występują co 3-5 lat. W USA co roku odnotowuje się 5000-7000 zachorowań. Stwierdzono, że 21% dorosłych w Stanach Zjednoczonych z przedłużającym się kaszlem (trwającym >2 tygodni) chorowało na krztusiec (4). Według szacunków WHO w 2008 r. na świecie wystąpiło około 16 milionów przypadków krztuśca, z czego 95% w krajach rozwijających się krajów, a około 195 000 dzieci zmarło z powodu tej choroby (5). Od 2011 r. w różnych regionach świata, nawet w tych, w których liczba szczepień utrzymywała się na wysokim poziomie, wielokrotnie odnotowywano wzrost liczby zachorowań na krztusiec. W Europie sytuacja rozwija się podobnie, w wielu krajach obserwuje się wzrost liczby zachorowań, głównie u niemowląt, młodzieży i dorosłych (6).

Uodpornianie i szczepienia: Niewiele wiadomo na temat czasu trwania ochrony po szczepieniu przeciwko krztuścowi w krajach rozwijających się, natomiast w kilku badaniach przeprowadzonych w krajach uprzemysłowionych wykazano, że ochrona słabnie po 4-12 latach (7, 8). Zakażenie u osób zaszczepionych wywołuje łagodniejszą, nieswoistą chorobę, bez klasycznych objawów klinicznych krztuśca i występuje tylko w 6% przypadków; zamiast tego choroba charakteryzuje się nieswoistym, przedłużającym się kaszlem, trwającym od kilku tygodni do kilku miesięcy. Z powodu tych nietypowych objawów krztusiec jest niedostatecznie diagnozowany u dorosłych i młodzieży, którzy mogą być rezerwuarem zakażenia dla nieszczepionych niemowląt (4, 6, 9).

Zarządzanie: Wczesne leczenie przeciwbakteryjne zmniejszy nasilenie objawów i ograniczy okres przenoszenia choroby. Szybka identyfikacja przypadków może pomóc w zapobieganiu zakażeniom u osób nieszczepionych lub niedostatecznie zaszczepionych poprzez szczepienia lub profilaktykę antybakteryjną.

Diagnostyka krztuśca: Diagnostyka laboratoryjna krztuśca może być przeprowadzona bezpośrednio (reakcja łańcuchowa polimerazy lub hodowla) lub pośrednio za pomocą testów serologicznych, które mierzą reakcję swoistych przeciwciał. Ponieważ bakterie bytują w górnych drogach oddechowych przez pierwsze trzy tygodnie zakażenia, można je wykryć w tym okresie tylko metodami bezpośrednimi (10, 11, 12).
Zalecane są testy serologiczne oparte na metodzie ELISA, mające na celu wykrycie przeciwciał toksyny krztuścowej, ponieważ takie metody pozwalają na rozróżnienie zakażenia *B. pertussis* i *B. parapertussis* (13). W przypadku diagnostyki serologicznej, znacząca zmiana ≥2-krotna w przeciwciałach przeciwko toksynie krztuścowej (wzrost lub spadek poziomu IgG) w sparowanych surowicach byłaby najbardziej wiarygodnym wskaźnikiem aktualnego ostrego zakażenia przy braku niedawnego szczepienia w ciągu ostatniego roku (13, 14). Jednak z różnych powodów najczęściej stosuje się jednopunktowe badanie serologiczne (13, 14, 15, 16). Stężenia przeciwciał przeciwko antygenom *B. pertussis* powinny być wyrażone ilościowo w jednostkach międzynarodowych na mililitr (IU/ml), ponieważ dostępne są preparaty referencyjne.

SeroPertussis™ Toxin IgG wykorzystuje oczyszczoną toksynę krztuścową jako antygen, umożliwiając ilościowe oznaczenie przeciwciał IgG przeciwko toksynie krztuścowej zgodnie z pierwszym Międzynarodowym Standardem WHO (WHO International Standard Pertussis Antiserum, human,[1st] IS NIBSC Code 06/140) (17).

Zasada badania

- Płytki mikrotitracyjne SeroPertussis™ Toxin są pokryte wzbogaconą frakcją wysoce oczyszczonej toksyny *Bordetella pertussis*.
- Surowica, która ma być testowana jest rozcieńczana w stosunku 1/101 i inkubowana na płytce SeroPertussis™ Toxin. W tym etapie swoiste przeciwciała dla toksyny *B. pertussis* są wiązane z unieruchomionymi antygenami.
- Nieswoiste przeciwciała są usuwane przez płukanie.
- Dodaje się anty-ludzką IgG sprzężoną z peroksydazą chrzanową (HRP). Na tym etapie koniugat HRP jest wiązany ze wstępnie związanym kompleksem antygen-przeciwciało.
- Niezwiązany koniugat jest usuwany przez płukanie.
- Dodaje się substrat TMB, który jest hydrolizowany przez peroksydazę, dając niebieski roztwór zredukowanego substratu.
- Po dodaniu roztworu zatrzymującego kolor niebieski zmienia się na żółty, a absorbancję należy odczytać za pomocą czytnika ELISA przy długości fali 450/620nm.
- Absorbancja jest proporcjonalna do poziomu swoistych przeciwciał, które są związane z opłaszczonymi antygenami.

Podsumowanie procedury: Ręcznaautomatyczna

Dodać 100 µl każdego kalibratora gotowego do użycia (RTU) C30, C60, C120 oraz 100 µl kontroli ujemnej, kontroli dodatniej i próbek rozcieńczonych w stosunku 1/101 do studzienek płytek mikrotitracyjnych pokrytych swoistymi białkami toksyny *krztuśca* o właściwościach immunodominujących

↓

Przykryć płytkę i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37ºC przy 100% wilgotności

↓

Przepłukać 5 razy buforem do płukania

↓

Dodać 100 µl koniugatu RTU-HRP

↓

Przykryć płytkę i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37ºC przy 100% wilgotności

↓

Przepłukać 5 razy buforem do płukania

↓

Dodać 100 µl substratu TMB

↓

Przykryć płytkę i inkubować 15 minut w temperaturze pokojowej

↓

Dodaj 100 µl roztworu zatrzymującego

↓

Odczytać absorbancję przy 450/620nm

↓

Obliczanie i interpretacja wyników

****Procedura automatyczna:***
Inkubacja próbki: *25 minut w RT, następnie dodatkowa inkubacja przez 35 minut w 35°C.*
Inkubacja koniugatu: *15 minut w RT, następnie dodatkowa inkubacja przez 35 minut w 35°C.*
Etapy płukania *5 cykli płukania.*

Zawartość zestawu do użytku ręcznego i

Zestaw testowy do 96 oznaczeń; nr kat. Nr 1231-01.

1. **Płytka mikrotitracyjna pokryta antygenem toksyny B. pertussis:**
   96 studzienek (8x12) opłaszczonych oczyszczonym antygenem toksyny *Bordetella pertussis*, zapakowanych w aluminiową saszetkę zawierającą środek osuszający.
   1 płytka
2. **Stężony bufor do płukania (20X):** Bufor PBS - Tween. Zawiera mniej niż 0,05% prokliny jako środka konserwującego.
   1 butelka, 100 ml
3. **Rozcieńczalnik do surowicy:** Gotowy do użycia roztwór buforowy zawiera mniej niż 0,05% prokliny jako środka konserwującego.
   2 butelki, 60 ml
4. **Kontrola pozytywna:** Gotowa do użycia dodatnia surowica ludzka *B. pertussis* Toxin IgG. Zawiera środki konserwujące niezawierające rtęci i azydków.
   1 fiolka, 2 ml
5. **Kontrola negatywna:** Gotowa do użycia negatywna surowica ludzka *B. pertussis* Toxin IgG. Zawiera środki konserwujące niezawierające rtęci i azydków.
   1 fiolka, 2 ml
6. **Kalibrator C30:** Gotowy do użycia kalibrator zawierający 30 IU/ml (arbitralnych jednostek międzynarodowych) ludzkich swoistych przeciwciał IgG przeciwko toksynie *B. pertussis* Zawiera środki konserwujące niezawierające rtęci ani azydków.
   1 fiolka, 2 ml
7. **Kalibrator C60:** Gotowy do użycia kalibrator zawierający 60 IU/ml (arbitralnych jednostek międzynarodowych) ludzkich swoistych przeciwciał IgG przeciwko toksynie *B. pertussis* . Zawiera środki konserwujące niezawierające rtęci i azydków.
   1 fiolka, 2 ml
8. **Kalibrator C120:** Gotowy do użycia kalibrator zawierający 120 IU/ml (arbitralnych jednostek międzynarodowych) ludzkich swoistych przeciwciał IgG przeciwko toksynie *B. pertussis* . Zawiera środki konserwujące niezawierające rtęci i azydków.
   1 fiolka, 2 ml
9. **Koniugat HRP:** Gotowy do użycia koniugat peroksydazy chrzanowej (HRP) z przeciwludzką IgG (γ specyficzne dla łańcucha). Zawiera środki konserwujące niezawierające rtęci i azydków.
   1 butelka, 15 ml
10. **Substrat TMB:** Gotowy do użycia roztwór. Zawiera 3, 3', 5, 5' - Tetrametylobenzydynę jako chromogen i nadtlenek jako substrat.
    1 butelka, 16 ml
11. **Roztwór zatrzymujący:** Gotowy do użycia roztwór. Zawiera 1M H_2SO_4.
    1 butelka, 16 ml
12. **Pokrywa płytki:** **1 szt.**
13. **Instrukcja obsługi:** **1**
14. **CD** **1**

Wymagane materiały, które nie są dostarczane

1. Czyste probówki do rozcieńczania surowic pacjentów.
2. Regulowane mikropipety i pipety wielokanałowe (zakresy 5- 50, 50-200 i 200-1000µl) oraz końcówki jednorazowe.
3. Kolba pomiarowa o pojemności jednego litra.
4. Jeden cylinder miarowy o pojemności 50 ml.
5. Butelka do płukania.
6. Papier chłonny.
7. Mieszadło Vortex
8. Łaźnia wodna o temperaturze 37°C z pokrywką lub komora wilgotnościowa umieszczona w inkubatorze o temperaturze 37°C.
9. Czytnik ELISA z filtrami 450 i 620 nm.
10. Woda destylowana lub podwójnie dejonizowana.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

1. Ten zestaw zawiera surowice ludzkie, które zostały przetestowane przy użyciu technik zatwierdzonych przez FDA i CE i zostały uznane za negatywne pod względem obecności HBsAg oraz przeciwciał HCV i HIV.

Ponieważ żadna znana metoda nie daje całkowitej pewności, że produkty pochodzące z krwi ludzkiej nie przenoszą zakażenia, wszystkie składniki krwi ludzkiej dostarczone w tym zestawie muszą być traktowane jako potencjalnie zakaźna surowica lub krew zgodnie z zaleceniami opublikowanymi w podręczniku CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988".

2. Roztwór substratu TMB jest materiałem drażniącym skórę i błony śluzowe. Unikać bezpośredniego kontaktu.
3. Wszystkie elementy tego zestawu zostały skalibrowane i przetestowane w poszczególnych partiach. Nie zaleca się mieszania składników z różnych partii, ponieważ może to mieć wpływ na wyniki.
4. Rozcieńczony kwas siarkowy (1M H_2SO_4) jest środkiem drażniącym dla oczu i skóry. W przypadku kontaktu z oczami, natychmiast przemyć miejsce kontaktu wodą i skonsultować się z lekarzem.

Przechowywanie i trwałość odczynników

1. Wszystkie dostarczone odczynniki powinny być przechowywane w temperaturze 2-8°C. Nieotwarte fiolki z odczynnikami zachowują trwałość do daty ważności podanej na opakowaniu zestawu. Wystawienie oryginalnie zamkniętych lub zapieczętowanych elementów na działanie temperatury otoczenia przez kilka godzin nie spowoduje uszkodzenia odczynników. **NIE ZAMRAŻAĆ!**
2. Po otwarciu zestawu jego okres przydatności wynosi 90 dni.
3. Niewykorzystane paski należy ponownie zamknąć w aluminiowej saszetce z kartą osuszającą, zwijając otwarty koniec i szczelnie zaklejając taśmą na całej długości otworu.
4. Podczas przechowywania w niskiej temperaturze w 20-krotnie stężonym buforze do płukania mogą tworzyć się kryształy, co jest całkowicie normalne. Przed rozcieńczeniem ponownie rozpuścić kryształy, ogrzewając bufor do temperatury 37°C. Po rozcieńczeniu roztwór może być przechowywany w temperaturze 2- 8°C do dwudziestu jeden dni.

Pobieranie surowicy

Przygotować surowice z aseptycznie pobranych próbek, stosując standardowe techniki. Nie należy stosować surowic inaktywowanych termicznie. Nie zaleca się stosowania surowic lipemicznych, mętnych lub zanieczyszczonych. Cząstki stałe i osady w surowicy mogą powodować błędne wyniki. Takie próbki powinny być przed badaniem oczyszczone przez odwirowanie lub filtrację.

Przechowywanie próbek

Próbki powinny być przechowywane w temperaturze 2-8°C i zbadane w ciągu 7 dni (zaleca się dodanie 0,1% azydku sodu). Jeśli przewidywany jest dłuższy okres przechowywania, należy pobrać i przechowywać próbki w temperaturze poniżej -20°C. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania.

Procedura testowa ręczna

A. Przygotowanie odczynników

1 Doprowadzić wszystkie składniki i badane próbki kliniczne do temperatury pokojowej. Przed użyciem delikatnie wymieszać kalibratory (C30, C60, C120), kontrolę ujemną, kontrolę dodatnią i próbki kliniczne.

2 Określić całkowitą liczbę próbek do badań. Oprócz próbek, w każdym badaniu należy uwzględnić następujące elementy: Trzy studzienki z kalibratorami (C30, C60, C120) i jedna studzienka z kontrolą ujemną. Badanie kontroli dodatniej jest opcjonalne.

3 Wyjąć płytkę mikrotitracyjną z aluminiowego woreczka, przecinając jeden koniec w pobliżu zgrzewu. Pozostawić wymaganą liczbę pasków (zgodną z liczbą próbek do badań) w ramce z 96 studzienkami.
Niewykorzystane paski należy ponownie zamknąć w aluminiowej saszetce z kartą osuszającą, zwijając otwarty koniec i szczelnie zaklejając taśmą na całej długości otworu.

4 Rozcieńczyć stężony bufor do płukania w proporcji 1/20 w podwójnie dejonizowanej lub destylowanej wodzie. Na przykład, aby przygotować jeden litr buforu do płukania, należy dodać 50 ml stężonego buforu do płukania do 950 ml wody podwójnie dejonizowanej lub destylowanej.

B. Inkubacja próbek surowicy i kontrole

5 Rozcieńczyć każdą surowicę pacjenta w stosunku 1/101 za pomocą dostarczonego rozcieńczalnika surowicy w następujący sposób: Dodać 10 µl surowicy pacjenta do 1000µl rozcieńczalnika surowicy.

6 Wprowadzić 100µl każdego z trzech kalibratorów C30, C60, C120), kontroli ujemnej, kontroli dodatniej i próbek surowicy do oddzielnych studzienek paska testowego.

7 Przykryć paski pokrywą płytki i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37°C w komorze wilgotnościowej.

8 Wylać płynną zawartość studzienek.

9 **Etap płukania**:
Płukanie ręczne:
Wypełnić każdą studzienkę buforem płuczącym do końca studzienki i wylać płyn, powtórzyć tę czynność, aby uzyskać w sumie 5 etapów płukania.
Płukanie automatyczne:
Wypełnić każdą studzienkę 350 ml buforu do płukania i wylać płyn, powtórzyć tę czynność, aby uzyskać w sumie 5 etapów płukania.

10 Osuszyć paski i ramkę, delikatnie stukając nimi o czysty papier chłonny.

C. Inkubacja z koniugatem

11 Do każdej studzienki wprowadzić 100µl gotowego do użycia koniugatu HRP.

12 Przykryć paski pokrywą płytki i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37°C w komorze wilgotnościowej.

13 Wylać płynną zawartość i przepłukać w sposób opisany w punktach 9-10.

D. Inkubacja z substratem TMB

14 Do każdej studzienki nałożyć 100µl substratu TMB, przykryć paski pokrywą i inkubować w temperaturze pokojowej przez **15 minut**.

15 Zatrzymać reakcję, dodając 100µl roztworu zatrzymującego (1M H_2SO_4) do każdej studzienki.

E. Oznaczanie wyników

16 Oznaczyć absorbancję przy długości fali 450/620nm i zapisać wyniki. Oznaczanie nie powinno trwać dłużej niż 30 minut od zatrzymania reakcji chromogenicznej.

- *Uwaga: Przed odczytem należy usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza. Należy dokładnie wytrzeć dno płytki ELISA.*

Procedura testowa automatyczna

Fiolki i objętość odczynnika zostały dostosowane do zastosowań w automatyce.

A. Przygotowanie odczynników

1. Doprowadzić wszystkie składniki i badane próbki kliniczne do temperatury pokojowej. Dobrze wymieszać kalibratory (C30,

C60, C120), kontrola ujemna, kontrola dodatnia i próbki kliniczne przed użyciem.

2. Określić całkowitą liczbę próbek do badań. Oprócz próbek, w każdym badaniu należy uwzględnić następujące elementy: Trzy studzienki z kalibratorami (C30, C60, C120) i jedna studzienka z kontrolą ujemną. Badanie kontroli dodatniej jest opcjonalne.
3. Wyjąć płytkę mikrotitracyjną z aluminiowego woreczka, przecinając jeden koniec w pobliżu uszczelki. Pozostawić wymaganą liczbę pasków (zgodną z liczbą próbek do badań) w ramce z 96 dołkami.
4. Rozcieńczyć stężony bufor do płukania w proporcji 1/20 w podwójnie dejonizowanej lub destylowanej wodzie. Na przykład, aby przygotować jeden litr buforu do płukania, należy dodać 50 ml stężonego buforu do płukania do 950 ml wody podwójnie dejonizowanej lub destylowanej.

B. Inkubacja próbek surowicy i kontrole

5. Rozcieńczyć surowicę każdego pacjenta w stosunku 1/101 w następujący sposób:
   - Dozować 750µl rozcieńczalnika surowicy do każdej probówki z próbką.
   - Aspirować 250µl rozcieńczalnika surowicy i 10µl surowicy pacjenta.
   - Dodać 260µl (1:26 wstępnie rozcieńczonej próbki) do każdej probówki z próbkami (objętość końcowa 1010µl w każdej probówce z próbkami).
6. Wprowadzić po 100µl kontroli ujemnej, kontroli dodatniej, trzech kalibratorów (C30, C60, C120) i próbek surowicy rozcieńczonych w stosunku 1:101 do osobnych studzienek na pasku testowym.
7. Inkubować przez 25 minut w temperaturze pokojowej (22-28°C). Czas inkubacji jest liczony od momentu dozowania pierwszej fiolki, jak wskazano w programie automatyzacji: "*Czas inkubacji od początku poprzedniego etapu badania*. Po inkubacji w temperaturze 22-28°C kontynuować inkubację przez 35 minut w temperaturze 35°C.
8. *Należy wyeliminować dryf oznaczeń spowodowany tą operacją.*
9. **Etap płukania:** Wykonać 5 cykli płukania po 500 µl z użyciem buforu do płukania Savyon.
10. Wykonać 2 cykle aspiracji, aby odessać resztki płynu z fiolki, zgodnie ze wskazaniami programu automatyzacji: *"Wykonać 2 cykle aspiracji bez zasysania. Tryb niepełnej płytki: utrzymanie czasu pełnej płytki"*

C. Inkubacja z koniugatem

Każda fiolka Koniugatu HRP może być użyta tylko dwa razy

11. Do każdej studzienki wprowadzić 100µl gotowego do użycia koniugatu HRP.
12. Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej (22-28°C). Czas inkubacji jest liczony od momentu dozowania pierwszej próbki fiolki, jak wskazano w programie automatycznym: "*Czas inkubacji od początku poprzedniego etapu badania*. Po inkubacji w temperaturze 22-28°C kontynuować przez 35 minut w temperaturze 35°C.
13. Przepłukać w sposób opisany w punktach 8-9.

D. Inkubacja z substratem TMB

14. Do studzienki wprowadzić 100µl substratu TMB i inkubować w temperaturze pokojowej (22-28°C) przez **15 minut**. Czas inkubacji jest liczony od momentu dozowania pierwszej fiolki, jak wskazano w programie automatyzacji: *"Czas inkubacji od początku poprzedniego etapu badania*"
15. Zatrzymać reakcję, dodając 100µl roztworu zatrzymującego (1M H_2SO_4) do każdej studzienki.

E. Oznaczanie wyników

16. Oznaczyć absorbancję przy długości fali 450/620nm i zapisać wyniki. Oznaczanie nie powinno trwać dłużej niż 30 minut od zatrzymania reakcji chromogenicznej

Należy pamiętać, że każdy automat posiada specyficzne polecenia techniczne. Procedurę automatyzacji Savyon dla tego zestawu należy wdrożyć do protokołu operacyjnego automatu.

Walidacja testu

Aby test był ważny, muszą być spełnione następujące kryteria. Jeśli te kryteria nie są spełnione, test należy uznać za nieważny i powtórzyć.

1. C120: OD ≥ 1.3
   C60: OD ≥ 0.9
   C30: OD ≥ 0,5
2. Stosunek OD C120 / OD C60: >1,3
3. Stosunek OD C60 / OD C30: >1,3
4. **Opcjonalnie:** Kontrola pozytywna: > 100 IU/ml (patrz rozdziały: Obliczanie i interpretacja wyników testu)
5. Kontrola negatywna: <15 IU/ml (patrz rozdziały - Obliczanie i interpretacja wyników testu)

Obliczanie wyników badań

W celu szybkiego obliczenia i interpretacji wyników testu należy użyć pliku " MASTER INTERPRETATION FOR SEROPT" (patrz załączony dysk).

OBLICZANIE WYNIKÓW TESTU MOŻNA RÓWNIEŻ WYKONAĆ PRZEZ:

1. Metoda ręczna, z użyciem kwadratowego papieru milimetrowego:

i. Wykreślić wartości absorbancji (OD) 3 kalibratorów (C30, C60 i C120) na osi X w stosunku do ich stężenia (j.m./ml) na osi Y.

ii. Korzystając z krzywej wzorcowej, interpolować stężenie badanych wartości próbek (w j.m./ml) z każdej zmierzonej absorbancji (patrz przykład 1).

2. Metoda komputerowa z wykorzystaniem programu MS-Excel:

i. Otworzyć arkusz kalkulacyjny MS-Excel

ii. W kolumnie B zaznaczyć wartości trzech kalibratorów (30, 60, 120), a w kolumnie A dodać odpowiadające im wartości OD.

iii. Kliknąć ikonę wykresu i wybrać wykres rozproszony. Wykreślić wykres wiersza B względem wiersza A.

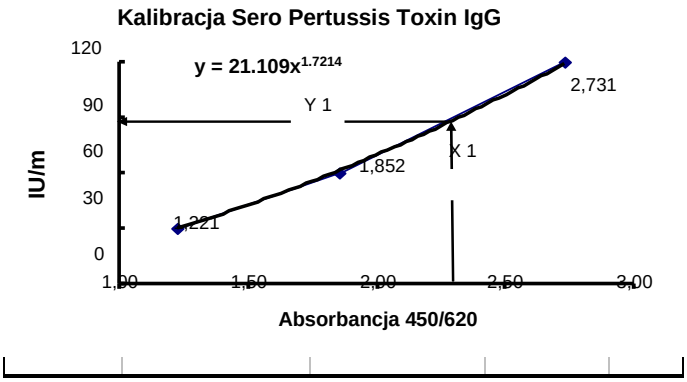
iv. Kliknąć prawym przyciskiem myszy na jeden z wykreślonych symboli i wybierz "Dodaj linię trendu...".

v. W zakładce "Typ" wybierz "Zasilanie", a w zakładce "Opcje" wybierz "Wyświetl równanie na w tabeli
Kliknąć przycisk "OK".

vi. Równanie w postaci $Y = aX^b$ zostanie wyświetlone
gdzie Y odpowiada stężeniu PT w IU/mL i X do $OD_{450}/_{620}$. Korzystając z tego równania, należy obliczyć stężenie PT na podstawie wartości OD dla każdej próbki (patrz przykład 1).

Przykład 1. Interpolacja wyników:
Odczytać wartość absorbancji próbki (X1) i zaznaczyć ją na osi X. Od tego punktu narysować pionową linię do krzywej kalibracyjnej, a od punktu przecięcia narysować linię poziomą do osi Y. Odczytać stężenie próbki w IU/ml.

Kalibrator	OD 450/620	IgG IU/ml
C30	1,221	30
C60	1,852	60
C120	2,731	120
Próbka	X1=2.235	Y1=84



Excel: (Y) =21.109*2.235^1.7214

Interpretacja wyników

1. Ważność wyników próbki: Jeśli $OD_{450/620}$ danej próbki wynosi ≥ 3,0, zaleca się ponowne zbadanie próbki w rozcieńczeniu 1:404. Wynik w IU/ml dla tej próbki należy następnie pomnożyć przez współczynnik 4.

2. Wartość graniczna: Zgodnie z najnowszą literaturą i zaleceniami laboratoriów referencyjnych z całej UE (16, 17) firma Savyon Diagnostics zaleca następującą interpretację wyników:

IgG IU/ml	Wynik	Interpretacja
<40 IU/ml	**Negatywny**	*Brak wskazań w przypadku ostrego zakażenia*
≥40 do <100 IU/ml	**Pośrednia**	*Możliwa infekcja; ponowne badanie IgG za 2-4 tygodnie lub badanie poziomu IgA*
≥100 IU/ml	**Pozytywny**	*Wskazanie na ostre zakażenie lub niedawny kontakt (w przypadku braku niedawnego szczepienia)*

3. Badanie próbek surowicy ozdrowieńców: Jeśli nie można ustalić rozpoznania z całą pewnością na podstawie jednej próbki surowicy (zakres pośredni), ale uważa się to za konieczne ze względu na objawy kliniczne, firma Savyon Diagnostics zaleca ponowne zbadanie drugiej próbki surowicy (ozdrowieńca) pobranej 2-4 tygodnie później (13,15). W najnowszej literaturze zaleca się, aby ≥ 2-krotna zmiana poziomu IgG wskazywała na aktualne ostre zakażenie (13, 14).

4. Badanie IgA i profilowanie przeciwciał: W przypadku braku dostępności drugiej próbki surowicy i w celu uzyskania pełnego profilu przeciwciał firma Savyon Diagnostics zaleca również badanie poziomu IgA (13,15):

IgG	IgA	Interpretacja
Negatywny	Negatywny	*Brak wskazań do zakażenia B. pertussis (patrz ograniczenia testu)*
Pośrednia	Negatywny	*Brak niedawnego zakażenia*
Średni lub ujemny	Pozytywny	*Wskazanie niedawnego zakażenia*
Pozytywny	Negatywny lub pozytywny	*Wskazanie niedawnego zakażenia*

Ograniczenia testu

1. Żaden pojedynczy test serologiczny nie powinien być stosowany do ostatecznej diagnozy. Należy wziąć pod uwagę wszystkie dane kliniczne i laboratoryjne.
2. Próbki pobrane zbyt wcześnie podczas pierwotnego zakażenia mogą nie zawierać wykrywalnych przeciwciał. Jeżeli podejrzewa się *B. pertussis*, należy pobrać drugą próbkę 2-4 tygodnie później i zbadać ją równolegle z próbką pierwotną.
3. W przypadku podejrzenia zakażenia u niemowląt poniżej 6 miesiąca życia należy wykonać inne badanie (hodowla, PCR), ponieważ u dzieci poniżej 6 miesiąca życia rzadko dochodzi do wytworzenia przeciwciał.
4. Nie należy przeprowadzać diagnostyki serologicznej w kierunku *zakażenia B. pertussis*, jeżeli szczepienie miało miejsce w okresie krótszym niż 1 rok.

Właściwości użytkowe

Precyzja
Precyzja w obrębie badania:

Próbka	Liczba powtórzeń	Średnia wartość OD	CV%
120IU/m	10	119	3,5
30IU/ml	10	32	7,1

Precyzja pomiędzy badaniami:

Próbka	Liczba powtórzeń	Średnia Wartość ODm	CV%
120IU/ml	10	122	6,3
30IU/ml	10	30	9,4

Bibliografia

1. Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly epidemiological record; No. 40; 2010, 85: 385–400; www.who.int/wer Tan T, Trindade E, Skowronski D. Epidemiology of pertussis. Pediatr. Infect. Dis. J. 24; 2005, 10-18.
2. Munoz FM. Pertussis in infants, children, and adolescents: diagnosis, treatment, and prevention. Semin. Pediatr. Infect. Dis. 17; 2006, 14-19.
3. Mattoo S. & Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other Bordetella subspecies; Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18:362-82.
4. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J. for the Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF; Global regional and

national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis; Lancet. 2010; 375: 1969–1987.
5. Zepp F, Heininger U, Mertsola J, Bernatowska E, Guiso N, Roord J, Tozzi AE, Van Damme P. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe; Lancet Infect. Dis. 2011; 11: 557–70.
6. Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, Englund JA. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. Pediatric Infectious Disease Journal; 2005, 24 (Suppl. 5): S58-S61.
7. The Global Pertussis Initiative Meeting report from the Fourth Regional Roundtable Meeting, France, April 14–15; Human Vaccines. 2010; 7:4, 481-488.
8. Srugo I, Benilevi D, Madeb R, Shapiro S, Shohat T, Somekh E, Rimmar Y, Gershtein V, Gershtein R, Marva E, Lahat N. Pertussis Infection in Fully Vaccinated Children in Day-Care Centers, Israel; Emerging Infectious Diseases. 2000; Vol. 6, No. 5 September-Oct.
9. HPA Guidelines for the Public Health Management of Pertussis. www.hpa.org.uk. October 2012.
10. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N; Pertussis PCR Consensus Group. nucleic acid amplification tests for diagnosis of Bordetella infections. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(10): 4925-9
11. ECDC TECHNICAL DOCUMENT; Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis;* Version 1.0, September 2012.
12. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, Wirsing von König CH; EU Pertstrain group EU Pertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2011; 30: 307–312.
13. André P, Caro V, Njamkepo E, Wendelboe AM, Van Rie A, Guiso N Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose Bordetella pertussis infection in 2007. J Clin Microbiol; 2008, 46(5):1672–1677
14. Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J, Wirsing von Koenig CH. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to Bordetella pertussis. J. Clin. Micro. 2010; 48(12); 4459-4463.
15. Xing D, Markey K, Newland P, Rigsby P, Hockley J, He Q. EUVAC. NET collaborative study: evaluation and standardization of serology for diagnosis of pertussis. J. Immunol. Methods. 2011; 372(1-2): 137-45
16. Xing D, Wirsing von König CH, Newland P, Riffelmann M, Meade BD, Corbel M, Gaines-Das R. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. Clin. Vaccine Immunol. 2009; 16(3): 303–311.

CE

Europejski upoważniony przedstawiciel: Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Bruksela, Belgia Tel:
+32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
E-mail:mail@obelis.net

	Limit temperatury
	Należy zapoznać się z instrukcją obsługi
IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Producent
EC REP	Upoważniony przedstawiciel europejski