



SeroPertussis™ IgA / IgM

Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός
προσδιορισμός (ELISA)
για τον ποιοτικό προσδιορισμό
ειδικών αντισωμάτων IgA και/ή IgM
έναντι της
Bordetella Pertussis
σε ανθρώπινο ορό

Φυλλάδιο οδηγιών

Διαγνωστικό σύνολο για 96
προσδιορισμούς
(Αρ. καταλόγου A233-01)

Για In Vitro διαγνωστική χρήση
Μόνο για επαγγελματική χρήση
Φυλάσσετε στους 2-8° C. **Μην
καταψύχετε**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St.

Ashdod 77610

ISRAEL

Τηλ.: +972.8.8562920

Φαξ: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Προοριζόμενη χρήση

Το διαγνωστικό σύνολο SeroPertussis™ IgA/IgM είναι ένας ποιοτικός ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) για τον προσδιορισμό ειδικών αντισωμάτων IgA και/ή IgM έναντι της *Bordetella pertussis*.

Το διαγνωστικό σύνολο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δύο ξεχωριστοί προσδιορισμοί για την ανίχνευση είτε των IgA είτε των IgM αντισωμάτων ή και των δύο.

Για **In Vitro** διαγνωστική χρήση. Μόνο για επαγγελματική χρήση.

Εισαγωγή

Ο κοκκύτης (Pertussis) είναι μια εξαιρετικά μεταδοτική βακτηριακή λοίμωξη του αναπνευστικού, η οποία προκαλείται από gram-αρνητικούς βακίλλους της *Bordetella pertussis*.

Εμφανίζεται κατά κανόνα στα παιδιά με παροξυσμικούς σπασμούς σοβαρού βήχα με σπαστικές εισπνοές και εμετό μετά το βήχα, που παραμένει για πολλές εβδομάδες.

Το αποτέλεσμα της νόσου είναι υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, ιδιαίτερα στα παιδιά.

Ο κοκκύτης είναι μια ενδημική νόσος, ωστόσο εμφανίζονται επιδημίες κάθε 3 – 5 χρόνια. Στις Η.Π.Α. αναφέρονται κάθε χρόνο 5000 – 7000 περιπτώσεις. Η εμφάνιση του κοκκύτη έχει μειωθεί κατά πολύ με τους μαζικούς εμβολιασμούς. Ωστόσο, η νόσος επανεμφανίζεται, ακόμα και σε χώρες με υψηλή κάλυψη εμβολιασμών⁽¹⁾. Παγκοσμίως, γίνεται διάγνωση 50 εκατομμυρίων περιπτώσεων κοκκύτη κατ' έτος και περίπου 350.000 άνθρωποι πεθαίνουν από τη νόσο⁽²⁾. Η εμφάνιση του κοκκύτη παρουσιάζει σταθερή αύξηση από το 1980⁽³⁾. Η ανοσία που προκαλείται με το εμβόλιο φθίνει μετά από 5 έως 10 χρόνια, καθιστώντας τον εμβολιασμένο ξενιστή ευάλωτο στη λοίμωξη. Η λοίμωξη σε εμβολιασμένα άτομα προκαλεί πιο ήπια, μη ειδική νόσο, χωρίς τα κλασικά κλινικά στάδια. Βήχας με σπαστικές εισπνοές παρατηρείται μόνον στο 6% αυτών των περιπτώσεων. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις η νόσος χαρακτηρίζεται από μη ειδικό, παρατεταμένο βήχα, που διαρκεί από αρκετές εβδομάδες έως μήνες. Λόγω αυτών των άτυπων συμπτωμάτων, ο κοκκύτης συχνά δεν διαγιγνώσκεται σε εφήβους και ενήλικους, οι οποίοι ενδέχεται να γίνουν ξενιστές, που μπορεί να μεταδώσουν το μικρόβιο σε μη εμβολιασμένα νήπια⁽⁴⁾. Παιδιά πολύ μικρά για πλήρη εμβολιασμό και εκείνα που δεν έχουν ολοκληρώσει ακόμα τη βασική σειρά εμβολιασμού είναι σε μεγαλύτερο κίνδυνο για σοβαρή νόσο.

Η νόσος είναι εξαιρετικά μεταδοτική και ποσοστό μέχρι και 90% των ευάλωτων ατόμων μέσα στην οικογένεια αναπτύσσουν την κλινική νόσο μετά από έκθεση στο μικρόβιο.

Η έγκαιρη αντιμικροβιακή θεραπεία μειώνει τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων και περιορίζει την περίοδο μεταδοτικότητας. Η άμεση ταυτοποίηση των περιπτώσεων μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της λοίμωξης μη εμβολιασμένων ή ελλιπώς εμβολιασμένων ατόμων μέσω του εμβολιασμού ή αντιμικροβιακής προφύλαξης.

Η εργαστηριακή διάγνωση του κοκκύτη μπορεί να γίνει είτε άμεσα μέσω καλλιέργειας, DFA ή PCR είτε με έμμεσες ορολογικές εξετάσεις. Επειδή τα βακτήρια παραμένουν στην ανώτερα αναπνευστική οδό τις πρώτες δύο εβδομάδες της λοίμωξης, αυτή μπορεί να ανιχνευτεί με άμεσες μεθόδους μόνον κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης περιόδου. Το δείγμα εκλογής για την άμεση ανίχνευση είναι ρινοφαρυγγικό (με χρήση αναρρόφησης ή στυλεού). Οι ορολογικές εξετάσεις βοηθούν τόσο στη διάγνωση άτυπων λοιμώξεων με παρατεταμένο βήχα όσο και για επιδημιολογικούς σκοπούς. Αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων έναντι της Τοξίνης του Κοκκύτη (PT) και της Νηματοδούς Αιμοσυγκολλητίνης (FHA) θεωρούνται ως ευαίσθητοι ορολογικοί δείκτες για τη διάγνωση του κοκκύτη σε ενήλικους και μη εμβολιασμένα παιδιά⁽⁵⁾. Σε μη εμβολιασμένα παιδιά, αυξήσεις των επιπέδων των αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης G (IgG) ή των αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης A (IgA)

σε ένα μόνο ή σε διάφορα αντιγόνα απαιτούνται για να πληρείται ο ορισμός της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) για τον κοκκύτη. Σε εμβολιασμένα παιδιά, ένα και μόνο δείγμα ορού ενδέχεται να είναι επαρκές για τη διάγνωση του κοκκύτη⁽⁶⁾.

Οι προσδιορισμοί SeroPertussis™ IgG και SeroPertussis™ IgA/IgM χρησιμοποιούν εμπλουτισμένο κλάσμα PT και FHA ως αντιγόνα, επιτρέποντας ευαίσθητη ανίχνευση αντισωμάτων IgA ή/και IgM και ημιποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG έναντι της *Bordetella pertussis*, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα για παρακολούθηση της ανοσολογικής κατάστασης και της κινητικής των αντισωμάτων.

Αρχή της εξέτασης

- Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης SeroPertussis™ είναι επιστρωμένες με εμπλουτισμένο κλάσμα τοξίνης και νηματώδους αιμοσυγκολλητίνης της *Bordetella pertussis*.
- Ο προς εξέταση ορός αραιώνεται σε αναλογία 1/100 και επωάζεται στην πλάκα SeroPertussis™. Στο βήμα αυτό, ειδικά αντισώματα έναντι της *B. pertussis* δεσμεύονται στα ακινητοποιημένα αντιγόνα.
- Τα μη ειδικά αντισώματα αφαιρούνται με έκπλυση.
- Προστίθεται αντι-ανθρώπινη IgA ή IgM συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Στο βήμα αυτό, το συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης δεσμεύεται στο ήδη δεσμευμένο σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος.
- Το μη δεσμευμένο αντιδραστήριο σύζευξης αφαιρείται με έκπλυση.
- Προστίθεται υπόστρωμα TMB και υδρολύεται από την υπεροξειδάση, δίνοντας κυανό διάλυμα του ανηγμένου υποστρώματος.
- Μόλις προστεθεί το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης, το κυανό χρώμα γίνεται κίτρινο και η απορρόφηση θα πρέπει να διαβαστεί με φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 450/620 nm.
- Η απορρόφηση είναι ανάλογη προς την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που έχουν δεσμευτεί στα επιστρωμένα αντιγόνα.

Διαδικασία προσδιορισμού

Προσθέστε 50 μl από τον ορό ελέγχου οριακής τιμής (cut-off), τον αρνητικό και τον θετικό ορό ελέγχου, και από τα αραιωμένα σε αναλογία 1/100 δείγματα στα βυθίσματα της πλάκας μικροτιτλοδότησης που είναι επιστρωμένα με ειδικές ανοσοεπικρατούσες πρωτεΐνες της *B. pertussis*.

↓
Καλύψτε την πλάκα και επωάστε επί 1 ώρα στους 37° C σε υγρασία 100%



Εκπλύνετε 3 φορές με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα
↓
Προσθέστε 50 μl από το αραιωμένο σε αναλογία 1/300 και συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης
↓
Καλύψτε την πλάκα και επωάστε επί 1 ώρα στους 37° C σε υγρασία 100%
↓
Εκπλύνετε 3 φορές με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα
↓
Προσθέστε 100 μl από το υπόστρωμα TMB
↓
Καλύψτε την πλάκα και επωάστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
↓
Προσθέστε 100 μl διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης
↓
Διαβάστε την απορρόφηση στα 450/620 nm
↓
Υπολογίστε και ερμηνεύστε τα αποτελέσματα

Περιεχόμενα του διαγνωστικού συνόλου

Διαγνωστικό σύνολο για 96 προσδιορισμούς

Αρ. κατ. A233-01

- Πλάκα μικροτιτλοδότησης επιστρωμένη με αντιγόνο *B. pertussis*:** 96 αποσπώμενα βυθίσματα (8x12) επιστρωμένα με αντιγόνα της *B. pertussis*, σε συσκευασία από αλουμίνιο που περιέχει ξηραντικό.
1 πλάκα
- Συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα (20X):** Ρυθμιστικό διάλυμα PBS - Tween. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιάλη, 100 ml
- Αραιωτικό ορού-RT:** Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιάλη, 60 ml
- Αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης:** Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιάλη, 40 ml
- Αρνητικός ορός ελέγχου IgA και IgM :** Ανθρώπινος ορός αρνητικός για *B. Pertussis* IgA και IgM, έτοιμος προς χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2 ml
- Θετικός ορός ελέγχου IgA και IgM:** Ανθρώπινος ορός θετικός για *B. pertussis* IgA και IgM, έτοιμος προς χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2 ml
- Ορός ελέγχου οριακής τιμής (cut-off) IgA:** Βαθμονομητής έτοιμος για χρήση, που

περιέχει ανθρώπινα ειδικά αντισώματα IgA έναντι της *B. Pertussis*, για τον προσδιορισμό της οριακής τιμής θετικότητας. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2,5 ml

8. **Ορός ελέγχου οριακής τιμής (cut-off) IgM:** Βαθμονομητής έτοιμος για χρήση, που περιέχει ανθρώπινα ειδικά αντισώματα IgM έναντι της *B. Pertussis*, για τον προσδιορισμό της οριακής τιμής θετικότητας. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2,5 ml

9. **Αντιδραστήριο σύζευξης IgA, συζευγμένο με HRP (300X):** Αντι-ανθρώπινη IgA (ειδική για την α αλυσίδα) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.

1 φιαλίδιο, 0,2 ml

10. **Αντιδραστήριο σύζευξης IgM, συζευγμένο με HRP (300X):** Αντι-ανθρώπινη IgM (ειδική για τη μ αλυσίδα) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.

1 φιαλίδιο, 0,2 ml

11. **Υπόστρωμα TMB:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 3, 3', 5, 5' - τετραμεθυλοβενζιδίνη ως χρωμογόνο και υπεροξειδίου ως υπόστρωμα.

1 φιάλη, 14 ml

12. **Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 1M H₂SO₄.

1 φιάλη, 15 ml

13. **Κάλυμμα πλάκας:** **1 τεμάχιο**

14. **Φυλλάδιο οδηγιών:** **1**

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες για την αραίωση των ορών των ασθενών.
2. Πλαστικό φιαλίδιο μίας χρήσης για την αραίωση του συμπυκνωμένου, συζευγμένου με HRP αντιδραστήριου σύζευξης.
3. Μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου και πολυκαναλές πιπέτες (εύρος όγκων σε μικρολίτρα 5-50, 50-200 και 200-1000μl) και ρύγχη μίας χρήσης.
4. Μία ογκομετρική φιάλη ενός λίτρου.
5. Ένας ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml.
6. Φιάλη έκπλυσης.
7. Απορροφητικό χαρτί.
8. Αναμεικτής στροβιλισμού (vortex).
9. Υδατόλουτρο 37° C με καπάκι ή υγραντικός θάλαμος τοποθετημένος μέσα σε επωαστήρα 37° C.
10. Φωτόμετρο ELISA με φίλτρο 450 και 620 nm.
11. Απεσταγμένο ή διπλά απιονισμένο νερό.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για *In Vitro* διαγνωστική χρήση

1. Το παρόν διαγνωστικό σύνολο περιλαμβάνει ανθρώπινους ορούς, οι οποίοι έχουν εξεταστεί με τεχνικές εγκεκριμένες από τον Οργανισμό

Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) και βρέθηκαν αρνητικοί για HBsAg και για αντισώματα έναντι των HCV και HIV. Ωστόσο, επειδή καμία γνωστή μέθοδος δεν μπορεί να διασφαλίσει πλήρως ότι προϊόντα που παράγονται από ανθρώπινο αίμα δεν μεταδίδουν λοίμωξη, ο χειρισμός όλων των συστατικών ανθρώπινου αίματος που παρέχονται με αυτό το διαγνωστικό σύνολο θα πρέπει να γίνεται σαν να επρόκειτο για δυνητικώς μολυσματικό ορό ή αίμα, σύμφωνα με τις συστάσεις που δημοσιεύθηκαν στο εγχειρίδιο του CDC/NIH υπό τον τίτλο "Βιολογική ασφάλεια σε Μικροβιολογικά και Βιοϊατρικά Εργαστήρια" (Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories), 1988.

2. Το διάλυμα του υποστρώματος TMB είναι υλικό που ερεθίζει το δέρμα και τους βλεννογόνους. Αποφύγετε την άμεση επαφή.
3. Όλα τα συστατικά αυτού του διαγνωστικού συνόλου έχουν βαθμονομηθεί και εξεταστεί ανά παρτίδα. Δεν συνιστάται η ανάμειξη συστατικών από διαφορετικές παρτίδες διότι αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.
4. Το αραιωμένο θειικό οξύ (1M H₂SO₄) είναι παράγοντας που ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα. Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και συμβουλευθείτε γιατρό.

Φύλαξη και διάρκεια ζωής των αντιδραστηρίων

1. Όλα τα παρεχόμενα υλικά πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C. Τα μη ανοιγμένα φιαλίδια αντιδραστηρίων παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του διαγνωστικού συνόλου. Η έκθεση των ανέγγιχτων πωματισμένων ή σφραγισμένων συστατικών του διαγνωστικού συνόλου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί λίγες ώρες δεν θα προκαλέσει βλάβη στα αντιδραστήρια. **ΜΗΝ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ!**
2. Μόλις ανοιχθεί το διαγνωστικό σύνολο, η διάρκεια ζωής του είναι 90 ημέρες.
3. Οι μη χρησιμοποιημένες σειρές μικροτιτλοδότησης πρέπει να σφραγίζονται εκ νέου μέσα στη συσκευασία από αλουμίνιο με το ξηραντικό, γυρίζοντας καλά το ανοιχτό άκρο και σφραγίζοντας ερμητικά με ταινία κατά μήκος του ανοίγματος.
4. Ενδέχεται να αναπτυχθούν κρύσταλλοι στο 20x συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα κατά τη διάρκεια της φύλαξης στο ψυγείο. Αυτό είναι απολύτως φυσιολογικό. Αναδιαλύστε τους κρυστάλλους θερμαίνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα στους 37° C πριν την αραίωση. Μόλις αραιωθεί, το διάλυμα μπορεί να φυλαχτεί στους 2-8° C μέχρι είκοσι μία ημέρες.

Συλλογή ορών

Προετοιμάστε τους ορούς από δείγματα που συλλέχθηκαν με ασηπτική διαδικασία χρησιμοποιώντας τις συνήθεις τεχνικές. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται οροί που αδρανοποιήθηκαν με θερμότητα. Η χρήση λιπαιμικών, θολών ή μολυσμένων ορών δε συνιστάται. Σωματίδια και ιζήματα στον ορό ενδέχεται να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τέτοια δείγματα θα πρέπει να διαυγάζονται μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης πριν από την εξέταση.

Φύλαξη δειγμάτων

Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C και να εξετάζονται εντός 7 ημερών (συνιστάται ιδιαίτερα η προσθήκη αζιδίου του νατρίου 0,1%). Αν αναμένεται μεγαλύτερη περίοδος φύλαξης, χωρίστε σε κλάσματα και φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία μικρότερη των -20° C. Αποφύγετε την επαναλημμένη απόψυξη και κατάψυξη.

Διαδικασία εξέτασης

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για τα IgA και τα IgM

A. Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

1. Φέρετε όλα τα συστατικά και τα προς εξέταση κλινικά δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμείξτε απαλά τον ορό οριακής τιμής (cut-off), τον αρνητικό ορό ελέγχου, το θετικό ορό ελέγχου και τα κλινικά δείγματα πριν από τη χρήση.
2. Καθορίστε το συνολικό αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων. Εκτός από τα δείγματα, σε κάθε εξέταση πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής: Ένα βύθισμα για τον αρνητικό ορό ελέγχου, ένα βύθισμα για το θετικό ορό ελέγχου και δύο βυθίσματα για τους ορούς οριακής τιμής (cut-offs).
3. Αφαιρέστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης από την αλουμινένια συσκευασία της κόβοντας το ένα άκρο κοντά στο σημείο του σφραγίσματος. Αφήστε τον απαιτούμενο αριθμό σειρών μικροτιτλοδότησης (ανάλογα με τον αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων) στο πλαίσιο των 96 βυθισμάτων.
Οι μη χρησιμοποιημένες σειρές μικροτιτλοδότησης πρέπει να σφραγίζονται εκ νέου μέσα στη συσκευασία από αλουμίνιο με το ξηραντικό, γυρίζοντας καλά το ανοιχτό άκρο και σφραγίζοντας ερμητικά με ταινία κατά μήκος του ανοίγματος.
4. Αραιώστε το συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1/20 με διπλά απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Για παράδειγμα, προκειμένου να ετοιμάσετε ένα λίτρο πλυστικού ρυθμιστικού διαλύματος, προσθέστε 50 ml συμπυκνωμένου πλυστικού ρυθμιστικού διαλύματος σε 950 ml διπλά απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού.

B. Επώαση των δειγμάτων ορών και των ορών ελέγχου

5. Αραιώστε κάθε ορό ασθενούς σε αναλογία 1/100 με το παρεχόμενο αραιωτικό ορού-RT ως εξής: Προσθέστε 10 μl από τον ορό του ασθενούς σε 190 μl αραιωτικού ορού-RT (1/20) και κατόπιν αραιώστε κι άλλο προσθέτοντας 25 μl από την αραιώση 1/20 σε 100 μl αραιωτικού ορού-RT.
6. Διανείμετε 50 μl από καθέναν από τα ακόλουθα: ορούς ελέγχου οριακής τιμής (cut-off) IgA και/ή IgM, αρνητικό ορό ελέγχου, θετικό ορό ελέγχου καθώς και 50 μl από τα αραιωμένα σε αναλογία 1/100 δείγματα ορού σε ξεχωριστά βυθίσματα της σειράς μικροτιτλοδότησης.
7. Καλύψτε τις σειρές μικροτιτλοδότησης με ένα κάλυμμα και επωάστε επί 1 ώρα σε 37° C μέσα σε υγραντικό θάλαμο.
8. Απορρίψτε το υγρό περιεχόμενο των βυθισμάτων.
9. **Βήμα έκπλυσης:**

Μη αυτόματη έκπλυση:

Γεμίστε κάθε βύθισμα με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι το στόμιο του βυθίσματος και απορρίψτε το υγρό, επαναλάβετε αυτό το βήμα δύο φορές επί συνόλου τριών βημάτων έκπλυσης.

Αυτοματοποιημένη έκπλυση:

Γεμίστε κάθε βύθισμα με 350 μl πλυστικού ρυθμιστικού διαλύματος και απορρίψτε το υγρό, επαναλάβετε αυτό το βήμα δύο φορές επί συνόλου τριών βημάτων έκπλυσης.

10. Στεγνώστε τις σειρές μικροτιτλοδότησης και το πλαίσιο χτυπώντας τα απαλά πάνω σε καθαρό απορροφητικό χαρτί.

Γ. Επώαση με το αντιδραστήριο σύζευξης

11. Το συμπυκνωμένο αντιδραστήριο αντι-ανθρώπινης IgA ή/και IgM συζευγμένο με HRP πρέπει να αραιώνεται σε διάλυμα εργασίας ακριβώς πριν από τη χρήση. Αραιώστε τη συμπυκνωμένη, συζευγμένη με HRP αντι-ανθρώπινη IgA ή IgM σε αναλογία 1/300 με το αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης. Για παράδειγμα: Για δύο σειρές, προετοιμάστε τουλάχιστον 3 ml από το αντιδραστήριο σύζευξης ως εξής: 10 μl από το συμπυκνωμένο, συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο αντι-ανθρώπινης IgA ή IgM αναμειγνύεται με 3 ml από το αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης.
12. Διανείμετε 50 μl από το αραιωμένο συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης σε κάθε βύθισμα.
13. Καλύψτε τις σειρές μικροτιτλοδότησης με ένα κάλυμμα και επωάστε επί 1 ώρα σε 37° C μέσα σε υγραντικό θάλαμο.
14. Απορρίψτε το υγρό περιεχόμενο και πλύνετε όπως περιγράφεται στα βήματα 9-10.

Δ. Επώαση με υπόστρωμα TMB

15. Διανείμετε 100 μl από το υπόστρωμα TMB σε κάθε βύθισμα, καλύψτε τις σειρές μικροτιτλοδότησης με ένα κάλυμμα και

επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί **15 λεπτά**.

16. Τερματίστε την αντίδραση προσθέτοντας 100μl από το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (1M H₂SO₄) σε κάθε βύθισμα.

Ε. Προσδιορισμός των αποτελεσμάτων

17. Προσδιορίστε την απορρόφηση στα 450/620 nm και καταγράψτε τα αποτελέσματα. Ο προσδιορισμός θα πρέπει να γίνει μέσα σε 30 λεπτά από τον τερματισμό της χρωμογόνου αντίδρασης.

- **Σημείωση:** Τυχόν φυσαλίδες αέρα θα πρέπει να αφαιρούνται πριν την ανάγνωση. Ο πυθμένας της μικροπλάκας ELISA πρέπει να καθαρίζεται προσεκτικά.

Επικύρωση της εξέτασης

Για να είναι έγκυρη η εξέταση, πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια. Αν δεν πληρούνται αυτά τα κριτήρια, η εξέταση θα πρέπει να θεωρείται άκυρη και να επαναλαμβάνεται.

1. OD_{θετικού ορού ελέγχου} ≥ 1,0
2. Ο λόγος OD_{θετικού ορού ελέγχου} / OD_{οριακής τιμής} > 2,0
3. OD_{αρνητικού ορού ελέγχου} < 0,25

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων της εξέτασης

1. Θα πρέπει να υπολογισθεί η μέση τιμή απορρόφησης του ορού οριακής τιμής (COC) που έχει τρέξει εις διπλούν.
2. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων από διαφορετικούς προσδιορισμούς, υπολογίζεται ο δείκτης οριακής τιμής (cut-off index, COI) σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:
3. COI = απορρόφηση του δείγματος ορού / μέση τιμή OD του ορού οριακής τιμής.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η ερμηνεία ισχύει και για τα IgA και για τα IgM

Απορρόφηση στα 450nm	COI	Αποτελέσματα	Διαγνωστική Ερμηνεία
OD < COC	< 1,0	Αρνητικό Δεν είναι ανιχνεύσιμα αντισώματα IgA ή IgM	Καμία ένδειξη λοίμωξης από B. pertussis (ανατρέξτε στην ενότητα Περιορισμοί της εξέτασης)
COC ≤ OD ≤ 1,1xCOC	1-1,1	Οριακό Θα πρέπει να ληφθεί και να εξετασθεί δεύτερο δείγμα μετά από 2-4 εβδομάδες (Εφόσον και το δεύτερο δείγμα είναι οριακό το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό)	
OD > 1,1x COC	> 1,1	Θετικό Υψηλά επίπεδα αντισωμάτων IgA ή και IgM	Ένδειξη πρόσφατης ή τρέχουσας λοίμωξης από B. pertussis

Προκειμένου να ληφθεί ένα πλήρες προφίλ των αντισωμάτων, θα πρέπει να γίνει και εξέταση και για IgM, IgA και IgG.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση το συνδυασμό της ανίχνευσης αντισωμάτων IgG, IgA και IgM.

Bordetella Pertussis			
IgG	IgA	IgM	
Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Καμία ένδειξη λοίμωξης από <i>B. pertussis</i> (ανατρέξτε στην ενότητα Περιορισμοί της εξέτασης)
Αρνητικό ή Θετικό	Αρνητικό ή Θετικό	Θετικό	Ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης
Θετικό	Αρνητικό ή Θετικό	Αρνητικό	Ένδειξη παρελθούσας ή τρέχουσας λοίμωξης
Αρνητικό ή Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης.

Περιορισμοί της εξέτασης

1. Για την τελική διάγνωση δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία μόνον ορολογική εξέταση. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα κλινικά και τα εργαστηριακά δεδομένα.
2. Δείγματα που λαμβάνονται σε πολύ αρχικό στάδιο πρωτογενούς λοίμωξης ενδέχεται να μην περιέχουν ανιχνεύσιμα αντισώματα. Αν υπάρχει υποψία για λοίμωξη από *B. pertussis*, πρέπει να ληφθεί δεύτερο δείγμα 2-4 εβδομάδες αργότερα και να εξετασθεί παράλληλα με το αρχικό δείγμα.
3. Όταν υπάρχει υποψία λοίμωξης σε βρέφη μικρότερα των 6 μηνών, θα πρέπει να εκτελεστεί άλλη εξέταση (καλλιέργεια, PCR) επειδή παιδιά μικρότερα των 6 μηνών σπανίως αναπτύσσουν αντισώματα.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Ακρίβεια για τα IgA

Ακρίβεια εντός του ιδίου προσδιορισμού (στην ίδια εκτέλεση):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση Τιμή OD	Σ.Δ. %
Θετικό	10	0,857	5,4
Αρνητικό	10	0,225	5,1

Ακρίβεια μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (σε διαφορετικές εκτελέσεις):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση Τιμή OD	Σ.Δ. %
Θετικό	10	0,911	5,6
Αρνητικό	10	0,147	6,1

Ακρίβεια για τα IgM

Ακρίβεια εντός του ιδίου προσδιορισμού (στην ίδια εκτέλεση):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση Τιμή OD	Σ.Δ. %
Θετικό	10	0,862	3,1
Αρνητικό	10	0,280	2,4

Ακρίβεια μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (σε διαφορετικές εκτελέσεις):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση Τιμή OD	Σ.Δ. %
Θετικό	10	0,906	5,7
Αρνητικό	10	0,238	6,9

Βιβλιογραφία

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

Glossary of Symbols:

Symbols for IVD components and Reagents			
	Manufacturer		In vitro diagnostic medical device
	EU Authorized representative		Consult instructions for use
	Contains Sufficient for <n> tests		Temperature limitation
	Catalogue Code		Use by Date
	Batch Number		CE mark
	Danger		Warning

CE

EU REP

European Authorized Representative:
MedNet EC-REP GmbH
Borkstrasse 10,
48163 Muenster, Germany