



SeroPertussis™ IgA/IgM

Dosaggio (ELISA)
Per la determinazione qualitativa degli
anticorpi specifici IgA e IgM anti-
Bordetella Pertussis
nel siero umano

Istruzioni per l'uso

Kit per 96 determinazioni
(Codice N°A233-01)

Per uso diagnostico ***In Vitro***
Solo per uso professionale
Conservare a 2-8°C. **Non congelare**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St.

Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Uso

Il kit SeroPertussis™ IgA/IgM è un dosaggio (ELISA) qualitativo per la determinazione degli anticorpi specifici IgA e/o IgM anti-*Bordetella pertussis*.

Questo kit può essere utilizzato come due dosaggi separati che permettono il rilevamento degli anticorpi IgA o IgM oppure di entrambi.

Per uso diagnostico ***In Vitro***. Solo per uso professionale.

Introduzione

La Pertosse (Pertussis) è una infezione batterica altamente contagiosa del tratto respiratorio causata da *Bordetella pertussis* – bacilli gram-negativi. Si manifesta tipicamente nei bambini con spasmi parossistici di tosse acuta; tosse convulsa e vomito post-tussivo che permane per molte settimane.

La malattia provoca un alto tasso di morbidità e mortalità, soprattutto nei bambini.

La Pertosse è una malattia endemica, ma con epidemie che si ripetono ogni 3–5 anni. Negli USA si registrano 5000–7000 casi ogni anno. L'incidenza della Pertosse è stata notevolmente ridotta con la vaccinazione di massa; peraltro, anche nei paesi con vaccinazione ad elevata copertura la

malattia sta ricomparendo⁽¹⁾. A livello mondiale si registrano quasi 50 milioni di casi di pertosse ogni anno e circa 350,000 persone muoiono a causa della malattia⁽²⁾. L'incidenza della pertosse è aumentata costantemente dal 1980⁽³⁾. L'immunità indotta da vaccino scompare dopo 5-10 anni, rendendo il soggetto vaccinato vulnerabile all'infezione. L'infezione nelle persone vaccinate provoca una malattia non-specifica più leggera, senza le fasi cliniche classiche. La pertosse è riscontrata solamente nel 6% di questi casi; peraltro la malattia è caratterizzata da una tosse non-specifica prolungata che dura da molte settimane a mesi. A causa di questi sintomi atipici la Pertosse è sotto diagnosticata negli adulti ed adolescenti che possono essere i portatori dell'infezione a bambini non vaccinati⁽⁴⁾. I bambini troppo piccoli per essere vaccinati in modo completo e quelli che non hanno ancora completato la serie di vaccinazioni primarie sono esposti al rischio maggiore di malattia acuta.

La malattia è altamente contagiosa e fino al 90% dei famigliari sviluppa la malattia clinica dopo l'esposizione.

Un trattamento anti-microbico precoce riduce la gravità dei sintomi e limita il periodo di contagio. Una pronta identificazione dei casi può aiutare a prevenire l'infezione delle persone non-vaccinate o sotto-vaccinate tramite vaccinazione o profilassi anti-microbica.

La diagnosi di laboratorio della Pertosse può essere diretta tramite coltura, DFA o PCR, o indiretta tramite test sierologici. Poiché i batteri risiedono nel tratto respiratorio superiore durante le prime due settimane dell'infezione, possono essere rilevati con metodi diretti soltanto durante questo periodo. Per il rilevamento diretto si preferisce il campione nasofaringeo (aspirazione o tampone). I test sierologici aiutano nella diagnosi d'infezioni atipiche, con tosse prolungata e per scopi epidemiologici. I livelli elevati di anticorpi anti-tossina della pertosse (PT) e anti-Emagglutinina Filamentosa (FHA) sono considerati marcatori sierologici sensibili nella diagnosi della Pertosse negli adulti e bambini non vaccinati⁽⁵⁾. Nei bambini non vaccinati, per rientrare nella definizione della Pertosse data dalla World Health Organization (WHO), sono necessari incrementi nei livelli di immunoglobulina G (IgG) o immunoglobulina A (IgA) contro un'antigene singolo o più antigeni. Nei bambini vaccinati è sufficiente un solo campione di siero per diagnosticare la Pertosse⁽⁶⁾.

SeroPertussis™ IgG e SeroPertussis™ IgA/IgM utilizzano una frazione arricchita di PT e FHA come antigeni, permettendo un rilevamento sensibile degli anticorpi IgA e/o IgM e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi IgG anti *Bordetella pertussis*, consentendo il follow-up dello stato immune e le cinetiche degli anticorpi.

Principio del Test

- Le micropiastre SeroPertussis™ sono rivestite con una frazione arricchita di tossina *Bordetella pertussis* e Emagglutinina Filamentosa.
- Il siero da sottoporre a test è diluito 1/100 e incubato sulla piastra SeroPertussis™. In questa fase gli anticorpi specifici B. pertussis si legano agli antigeni immobilizzati.
- Gli anticorpi non-specifici sono eliminati mediante lavaggio.
- Si aggiunge il coniugato anti IgA e/o IgM umano marcato con perossidasi di rafano (HRP). In questa fase il coniugato HRP si lega al complesso antigene-anticorpo precedentemente legato.
- Il coniugato non legato è eliminato mediante lavaggio.

- Si aggiunge il substrato TMB che è idrolizzato dalla perossidasi e colora di blu la soluzione di Substrato ridotto.
- Dopo l'aggiunta della soluzione di arresto il colore blu diventa giallo e si esegue la lettura con un lettore ELISA alla lunghezza d'onda di 450/620nm.
- La densità ottica è proporzionale ai livelli di anticorpi specifici legati agli antigeni fissati alla fase solida.

Procedura del test

Aggiungere 50µl di Controllo Cut Off, Controllo Negativo, Controllo Positivo, e 1/100 di campioni diluiti ai pozzetti rivestiti con proteine specifiche immunodominanti di *B.pertussis*



Coprire ed incubare per 1 ora a 37°C al 100% di umidità



Lavare 3 volte con Soluzione Tamponata di Lavaggio



Aggiungere 50µl di Coniugato HRP diluito 1/300



Coprire ed incubare per 1 ora a 37°C al 100% di umidità



Lavare 3 volte con Soluzione Tamponata di Lavaggio



Aggiungere 100µl di Substrato TMB



Coprire ed incubare per 15 min. a temperatura ambiente



Aggiungere 100 µl di Soluzione di Arresto



Leggere a 450/620nm



Calcolare ed interpretare i risultati

Materiali forniti

Kit per 96 Determinazioni

Codice N° A233-01E

1. **Micropiastra rivestita con antigene *B. pertussis*:** 96 pozzetti separabili (8x12) rivestiti con antigeni *Bordetella pertussis*, confezionati in una custodia di alluminio contenente una carta essiccante.
1 micropiastra
2. **Soluzione Tamponata di Lavaggio Concentrata (20X):** Un Tampone PBS - Tween. Contiene proclin come conservante in quantità inferiore allo 0.05%.
1 flacone, 100 ml
3. **Diluyente del Campione-RT:** Soluzione tamponata pronta per l'uso contenente anti-IgG umane. Contiene proclin come conservante in quantità inferiore allo 0.05%.
1 flacone, 60 ml
4. **Diluyente del Coniugato:** Soluzione tamponata pronta per l'uso. Contiene proclin come conservante in quantità inferiore allo 0.05%.
1 flacone, 40 ml
5. **Controllo Negativo IgA e IgM:** Siero umano negativo per IgA e IgM anti *B. pertussis* pronto per l'uso. Contiene conservante proclin in quantità inferiore allo 0.05%. e conservante Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1%.
1 fiala, 2 ml

6. **Controllo Positivo IgA e IgM:** Siero umano positivo per IgA e IgM anti *B.pertussis* pronto per l'uso. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05%. e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2 ml
7. **Controllo Cut-Off IgA:** Calibratore pronto per l'uso, contenente anticorpi umani IgA specifici per *B.pertussis*, utilizzato per la determinazione del cut-off. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05%. e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2.5 ml
8. **Controllo Cut-Off IgM:** Calibratore pronto per l'uso contenente anticorpi umani IgM specifici per *B.pertussis*, utilizzato per la determinazione del cut-off. Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05%. e Sodio Azide in quantità inferiore allo 0.1% come conservanti.
1 fiala, 2.5 ml
9. **Coniugato HRP IgA (300X):** Coniugato (HRP) anti IgA umane marcato con perossidasi di rafano (catena α specifiche). Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% come conservante.
1 fiala, 0.2 ml
10. **Coniugato HRP IgM (300X):** Coniugato (HRP) anti IgM umane marcato con perossidasi di rafano (catena μ specifiche). Contiene proclin in quantità inferiore allo 0.05% come conservante.
1 fiala, 0.2 ml
11. **Substrato TMB:** Soluzione pronta per l'uso. Contiene 3, 3', 5, 5' - Tetrametil-benzidina come cromogeno e perossidasi come substrato.
1 flacone, 14 ml
12. **Soluzione di Arresto:** Soluzione pronta per l'uso. Contiene H₂SO₄ 1M
1 flacone, 15 ml
13. **Coperchio:** **1 pezzo**
14. **Istruzioni per l'uso:** **1 pezzo**

Materiali Richiesti ma non Forniti

1. Provette pulite per la diluizione dei sieri dei pazienti.
2. Flacone di plastica monouso per la diluizione del coniugato HRP concentrato.
3. Micropipette regolabili e pipette multicanale (da 5-50, 50-200 e 200-1000µl) e puntali monouso.
4. Un flacone volumetrico da 1 litro.
5. Un cilindro volumetrico da 50ml.
6. Flacone di lavaggio.
7. Carta assorbente.
8. Vortex
9. Bagnomaria a 37°C con coperchio, o camera umida sistemata in incubatore a 37°C.
10. Lettore ELISA con filtri a 450 e 620nm.
11. Acqua distillata o bi-deionizzata.

Avvertenze e Precauzioni

Per Uso Diagnostico In Vitro

1. Questo kit contiene sieri umani testati con tecniche approvate dalla FDA e risultati negativi ai test per HBsAg e per gli anticorpi HCV e HIV 1 & 2. Poiché nessun test può garantire che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano infezioni, tutti i componenti di sangue umano forniti in questo kit

devono essere manipolati come potenzialmente infettivi, in conformità alle raccomandazioni pubblicate nel manuale CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988".

2. La soluzione di Substrato TMB è irritante per la pelle e le mucose. Evitare il contatto diretto.
3. Tutti i componenti del kit sono stati calibrati e testati per singolo lotto. Si sconsiglia di mescolare componenti da lotti diversi, in quanto i risultati potrebbero essere falsati.
4. L'acido solforico diluito (1M H₂SO₄) è irritante per gli occhi e la pelle. In caso di contatto con gli occhi sciacquare con acqua e consultare un medico.

Conservazione e Scadenza dei Reagenti

1. Tutti i reagenti forniti devono essere conservati a 2-8°C. Le fiale integre sono stabili sino alla data di scadenza indicata sulla confezione del kit. L'esposizione a temperatura ambiente dei componenti in confezione originale sigillata per alcune ore non è dannoso ai reagenti. **NON CONGELARE!**
2. Il kit ha una durata di 90 giorni dopo l'apertura.
3. Le strisce inutilizzate devono essere riposte nella custodia di alluminio con la carta essiccante, ripiegando il lato aperto e sigillando accuratamente con nastro tutta la lunghezza dell'apertura.
4. Durante la conservazione a freddo la formazione di cristalli nella Soluzione Tamponata di Lavaggio concentrata 20x è del tutto normale. Sciogliere i cristalli portando la soluzione a 37°C prima di diluire. Dopo la diluizione la soluzione può essere conservata fino a 21 giorni a 2-8°C.

Raccolta dei Sieri

Preparare i sieri da campioni asettici raccolti con tecniche standard. Non utilizzare sieri inattivati con trattamento termico. Si sconsiglia l'uso di sieri lipemici, torbidi o contaminati. Particelle e precipitati nei sieri potrebbero causare falsi risultati. Questi campioni devono essere chiarificati mediante centrifugazione o filtraggio prima di effettuare il test.

Conservazione dei Campioni

I campioni devono essere conservati a 2-8°C e utilizzati entro 7 giorni (si raccomanda l'aggiunta dello 0.1% di Sodio Azide). Nel caso si preveda la conservazione per periodi più lunghi aliquotare e conservare i campioni a -20°C. Evitare di congelare e scongelare i campioni più volte.

Procedura del Test - Manuale

Protocollo di automazione disponibile su richiesta

Utilizzare la stessa procedura per IgA e IgM.

A. Preparazione dei Reagenti

1. Portare tutti i componenti ed i campioni clinici da testare a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente il Controllo Cut-Off, il Controllo Negativo, il Controllo Positivo ed i campioni clinici prima dell'uso.
2. Determinare il numero di campioni da testare. In aggiunta ai campioni includere in ogni dosaggio i seguenti componenti: un pozzetto di Controllo Negativo,

un pozzetto di Controllo Positivo e due pozzetti di Controllo di Cut-Off.

3. Estrarre la micropiastra dalla custodia di alluminio, tagliando un lato vicino al sigillo. Posizionare il numero di strisce necessarie (a seconda del numero di campioni da testare) nel supporto da 96 pozzetti. Le strisce inutilizzate devono essere riposte nella custodia di alluminio con la carta essiccante ripiegando il lato aperto e risigillando accuratamente con nastro su tutta la lunghezza dell'apertura.
4. Diluire 1/20 la Soluzione Tamponata di Lavaggio Concentrata con acqua bi-deionizzata o distillata. Ad esempio, per preparare un litro di soluzione tamponata di lavaggio aggiungere 50ml della Soluzione Tamponata di Lavaggio Concentrata a 950ml di acqua bi-deionizzata o distillata.

B. Incubazione dei campioni e dei controlli

5. Diluire ciascun campione di siero del paziente 1/100 con il Diluente del Campione-RT fornito come segue: Aggiungere 10 µl di siero del paziente a 190µl di Diluente del Campione-RT (1/20), e poi diluire ulteriormente aggiungendo 25µl della soluzione diluita 1/20 a 100µl del Diluente del Campione-RT.
6. Dispensare 50µl di ciascun Controllo di Cut-Off IgA e/o IgM e 50µl del controllo negativo e positivo e dei campioni diluiti 1/100 in pozzetti separati della piastra.
7. Coprire le strisce con il coperchio ed incubare per 1 ora a 37°C in una camera umida.
8. Eliminare il contenuto liquido dei pozzetti.
9. **Lavaggi:**

Lavaggio Manuale:

Riempire ciascun pozzetto fino al bordo con la soluzione tamponata di lavaggio ed eliminare il liquido. Ripetere altre due volte per un totale di tre lavaggi.

Lavaggio Automatico:

Riempire ciascun pozzetto con 350ul di soluzione tamponata di lavaggio ed eliminare il liquido. Ripetere altre due volte per un totale di tre lavaggi.

10. Asciugare le strisce ed il supporto battendo delicatamente su carta assorbente.

C. Incubazione con coniugato

11. Diluire il Coniugato HRP anti IgA e/o anti IgM umane immediatamente prima dell'uso. Diluire il rispettivo coniugato concentrato HRP anti IgA e/o IgM umane 1/300 con il Diluente del Coniugato. Ad esempio: per due strisce preparare almeno 3 ml di coniugato come segue: 10 µl di Coniugato HRP anti IgA o IgM umane concentrato mescolato con 3ml di Diluente del Coniugato.
12. Dispensare 50µl di Coniugato HRP diluito in ciascun pozzetto.
13. Coprire le strisce con il coperchio ed incubare per 1 ora a 37°C in una camera umida.
14. Eliminare il liquido contenuto e lavare come descritto ai precedenti punti 9-10.

D. Incubazione con il Substrato TMB

15. Dispensare 100µl di Substrato TMB in ciascun pozzetto, coprire con il coperchio ed incubare a temperatura ambiente per **15 minuti**.
16. Arrestare la reazione aggiungendo 100µl di Soluzione di Arresto (1M H₂SO₄) in ciascun pozzetto.

E. Determinazione dei Risultati

17. Determinare le densità ottiche a 450/620nm e registrare i risultati. La determinazione non deve superare i 30 minuti dall'arresto della reazione cromogena.

- **Nota:** Eliminare eventuali bolle d'aria prima di effettuare la lettura. Pulire accuratamente il fondo della piastra ELISA.

Validazione del Test

E' necessario rispettare i criteri sottoelencati al fine considerare il test valido. Se questi criteri non vengono rispettati il test deve essere considerato non valido e deve essere ripetuto.

1. DO Controllo Positivo ≥ 1.0
2. Rapporto DO Controllo Positivo / DO Cut -Off > 2.0
3. DO Controllo Negativo < 0.25

Calcolo dei Risultati del Test

1. Calcolare le densità ottiche medie del dosaggio del Controllo Cut-Off in duplicato.
2. Per normalizzare i risultati ottenuti in test differenti, l'indice di cut-off (COI) è calcolato con la seguente formula:
3. COI = Assorbanza del campioni/ DO media del Controllo Cut-Off (COC).

Interpretazione dei Risultati

L'interpretazione è valida sia per IgA che per IgM

Assorbanza a 450nm	COI	Risultati	Interpretazione Diagnostica
DO < COC	<1.0	Negativo Anticorpi IgA o IgM non rilevabili	Nessuna indicazione di infezione da <i>B.pertussis</i> (vedi Limiti del Test)
COC $\leq$ DO $\leq$ 1.1xCOC	1-1.1	Borderline Prelevare un secondo campione dopo 2-4 settimane e testare (Se il secondo campione è borderline il risultato è da considerare negativo).	
DO >1.1. x COC	>1.1	Positivo Livelli significativi di anticorpi IgA e/o IgM	Indicazione di infezione in atto da <i>B.pertussis</i>

Per ottenere un profilo completo degli anticorpi si dovrebbero effettuare i test per tutte e tre le classi IgA, IgM e IgG.

Interpretazione dei risultati in base al rilevamento di anticorpi IgM, IgA e IgG.

Bordetella Pertussis			
IgG	IgM	IgA	
Negativo	Negativo	Negativo	Nessun indicazione di infezione da <i>B.pertussis</i> (vedi Limiti del Test)
Negativo o Positivo	Positivo	Negativo o Positivo	Indicazione di infezione in atto
Positivo o Negativo	Negativo	Positivo	Indicazione di infezione recente
Positivo	Negativo	Negativo	Indicazione di infezione recente o passata o di immunizzazione precedente

Limiti del Test

1. La diagnosi finale non deve basarsi solo sul test sierologico. E' necessario prendere in considerazione tutti i dati clinici e di laboratorio.
2. Campioni prelevati troppo presto durante l'infezione primaria possono non contenere anticorpi rilevabili. Nel caso di sospetta *B.pertussis* si deve prelevare un secondo campione dopo 2-4 settimane e testare in parallelo con il campione originale.
3. Nel caso di sospetta infezione in bambini sotto i sei mesi di età si deve eseguire un test diverso (coltura, PCR) poiché questi soggetti raramente sviluppano anticorpi.

Caratteristiche

Precisione per IgA

Precisione IgA intra-saggio:

Campione	N° di Repliche	Valore DO medio	CV%
Positivo	10	0.857	5.4
Negativo	10	0.225	5.1

Precisione IgA inter-saggio:

Campione	N° di Repliche	Valore DO medio	CV%
Positivo	10	0.911	5.6
Negativo	10	0.147	6.1

Precisione per IgM

Precisione IgM Intra-saggio:

Campione	N° di Repliche	Valore DO medio	CV%
Positivo	10	0.862	3.1
Negativo	10	0.280	2.4

Precisione IgM Inter-saggio:

Campione	N° di Repliche	Mean DO Value	CV%
Positivo	10	0.906	5.7
Negativo	10	0.238	6.9

Bibliografia

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. Sruogo 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