

Instruction

PERTUSSCAN PT IgG

ELISA for detection of IgG against *Bordetella pertussis* toxin (PT)
in serum

Microtitration strips (12x8) 96 wells
Store the kit at +2-8° C
For in vitro diagnostic use only



Doc. No. E-23-0207-02
October, 2013

PERTUSSCAN PT IgG

English:	page	2
Français:	page	17
Español:	página	32
Deutsch:	Seite	47
Italiano:	pagina	62
Dansk:	side.....	77
Norsk:	side.....	92
Svenska:	sida.....	107



PERT-PTG2



INTENDED USE OF THE TEST

Pertuscan PT IgG is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG antibodies against Bordetella pertussis toxin (PT) in serum specimens. The test is intended for determination of current/recent infection.

The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

“For in vitro diagnostic use”.

SUMMARY AND EXPLANATION

Pertussis, or whooping cough, is a contagious bacterial disease caused by the bacterium Bordetella pertussis.

Symptoms are initially mild (resembles those of a common cold), but will develop into severe coughing fits, which produce the namesake high-pitched "whoop" sound in infected babies and children when they inhale air after coughing. The coughing stage lasts for approximately six weeks before subsiding. Prevention via vaccination is of primary importance as treatment is of little clinical benefit to the person infected. Antibiotics, however, do decrease the duration of infectiousness and are thus recommended in many countries. The Pertussis Toxin (PT) is of significant importance for the pathogenesis of whooping cough. It is a real exotoxin responsible for many physiological, immunological and pharmacological effects. In addition the Pertussis toxin is highly specific for B. pertussis in contrast to some other exotoxins of the species Bordetella. Serology with determination of IgG against PT has proven especially useful for later diagnosis of older children and adults.

PRINCIPLE OF THE TEST

The assay consists of microtitre strips coated with highly purified PT as antigen. In infected individuals the antibodies produced against PT will bind to its antigen. Alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG will bind to the human antibodies attached to the antigen. When the substrate is added a yellow colour will develop, the intensity of which (read in a photometer), is proportional to the amount of bound antibodies.

MATERIALS PROVIDED

One frame with microtitre strips (12x8) wells coated with PT antigen, packed in foil pouch with desiccant

Controls

PT IgG positive control. Ready-to-use

1 vial containing 1.5 mL, blue solution

PT IgG negative control (labelled Green). Ready-to-use

1 vial containing 4.0 mL, blue solution

Sample dilution buffer. Ready-to-use

2 vials containing 25 mL, blue solution

Wash buffer

1 vial containing 35 mL, 40 x concentrated

Conjugate

Anti-human IgG conjugate. Ready-to-use

2 vials containing 6.0 mL, orange solution

Substrate tablets

1 Strip containing 6 x 1 tablet

Substrate buffer

1 vial containing 30 mL

Stop solution

1 vial containing 30 mL

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader with filter 405 nm.
- Precision pipettes with disposable tips.
- Washer for strips, absorbent tissue, tubes and a timer.
- Incubation blocks or incubator (37°C).
- Non-metallic container for preparation of substrate solution.

REAGENTS

All reagents should have reached room temperature when used.

Sample dilution buffer. Contains phosphate buffered saline (PBS), 0.09% sodium azide. Ready-to-use.

Wash buffer, 40 x concentrated. 29% sodium chloride, 2% Tween 20 and 0.09% sodium azide. Dilute before use.

Controls

One PT IgG positive human serum and one PT IgG negative human serum. All sera are tested HBsAg and HIV- and HCV- antibody negative. Both controls are ready-to-use.

The conjugate contains goat-anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase. Ready-to-use.

Substrate tablets. P-Nitrophenyl phosphate, 5 mg/tablet.

Please note! Contact with metal should be avoided.

Substrate buffer. Contains 1M Diethanolamine and 0.5 mM Magnesium Chloride. Ready-to-use.

Stop solution. Contains 0.4 M sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH >10). Do not allow the reagent to get into contact with the skin. Ready-to-use.

SAFETY AND PRECAUTIONS

General

Serum samples to be tested may contain infectious agents and should be handled accordingly.

Do not pipette by mouth, smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are handled.

Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.

ELISA plate

The microtitre strips should be handled with caution. To avoid contamination of wells never touch top of strips with fingers. Pipette carefully to avoid scratching the inside of the well. Check for air bubbles in wells after completed pipetting. If present, remove them by gently tapping the strip-holder.

Positive control

Contains human serum positive for PT IgG. Should be regarded as potentially infectious. Handle with caution. Tested negative for HIV- and HCV antibody and HbSAg.

Negative control

Contains human serum negative for PT IgG. Shall be regarded as potentially infectious. Handle with caution. Tested negative for HIV-and HCV-antibody and HbSAg.

Conjugate, sample diluent buffer

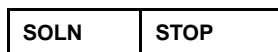
Contain biological material. Handle with caution.

Stop solution

Contains 0.4 M sodium hydroxide. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Spillage should be mopped with copious amounts of water. If contact with skin or eyes occurs, irrigate with water and seek medical attention immediately.



Warning



Contains: Sodium hydroxide

- H315: Causes skin irritation.
 H319: Causes serious eye irritation.
 P264: Wash hands thoroughly after handling.
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P302+352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
 P305+351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
 +338: Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
 P332+313: If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
 P337+313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Because no test methods can offer complete assurance that HIV, HCV, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent, specimens and human-based reagents should be handled as if capable of transmitting infectious agents.

The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommend that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.

Substrate buffer

Contains 9,7% Diethanolamine



SUBSBUF

Warning

Contains: Diethanolamine

- H319: Causes serious eye irritation.
- P264: Wash hands thoroughly after handling.
- P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
- P305+351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
- +338: Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
- P337+313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

STORAGE INSTRUCTIONS

General

Always store test kit and its contents at 2-8° C.
Test kit and its contents should have reached room temperature before use.

DO NOT USE KITS OR COMPONENTS THAT HAVE PASSED EXPIRY DATE.
DO NOT MIX REAGENTS WITH DIFFERENT BATCH NUMBERS.

Substrate solution

Prepared substrate solution should be used within the same day.
Keep in the dark at room temperature (20-23° C).

Wash solution

Use prepared wash solution within 3 weeks. Store at room temperature (20-23° C).

Microtitre strips

Remove only the number of strips needed for testing, resealing the aluminium foil pouch carefully. Store at 2-8° C.

PREPARATION OF REAGENTS

All reagents should have reached room temperature when used.

Wash solution

Dilute 1 bottle of wash buffer (35 mL) to 1400 mL with distilled water. The prepared amount of wash buffer solution is sufficient for 12 microtitre strips and is stable for 3 weeks at 20-23° C.

Substrate solution

Prepare only the amount sufficient for one day use (100 µL/well).
1 substrate tablet dissolved in 5 mL substrate solution.

Please note! The substrate solution is stable for 1 day. Keep the prepared solution in the dark and not above room temperature.

WASHING INSTRUCTIONS

Always start the test procedure by washing each well four times.

Follow the washing instructions closely as incomplete washing may endanger the test result. Washing can be performed either by automatic microtitre plate washer or manually.

Washing with automatic microtitre plate washing equipment

When using automatic plate washing equipment, check that all wells can be aspirated completely and that the wash buffer is correctly dispensed reaching the rim of each well during each washing cycle. The washer should be programmed to execute 4 washing cycles. Continue immediately to the next reagent addition step.

Manual washing

1. Fill all the wells with 0.3 mL wash solution.
2. Let the filled wells stand for at least 30 seconds.
3. Empty the wells by turning the microtitre plate upside down followed by a firm short vertical movement.
4. This washing cycle (1, 2, and 3) should be carried out 4 times.
5. Place the inverted plate on absorbent paper towels and tap the plate firmly in order to remove residual wash solution in the wells.
6. Continue immediately to the next reagent addition step.

Do not scratch inside of well.

COLLECTION OF SAMPLES

Pertuscan PT IgG assay is for use with serum. Handle as if capable of transmitting infectious agents. Avoid using sera which are icteric, lipemic or hemolyzed.

Heat-inactivated sera can yield unspecific reactivities and should not be used.

Store serum between 2-8° C if testing will take place within five days. If specimens are to be kept for longer periods, store at -20° C or colder. Do not use a frost-free freezer because it may allow the specimens to go through freeze-thaw cycles and degrade antibody. Samples that are improperly stored or are subjected to multiple freeze-thaw cycles may yield spurious results.

The CLSI provides recommendations for storing blood specimens (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Paired samples

The most reliable method to diagnose a current/recent pertussis infection is by showing a significant titre rise (= a doubling of the absorbance value) in IgG between the acute and the convalescent sample.

An acute sample is defined as being drawn within:

2-3 weeks for unvaccinated children

<7 days for vaccinated children and adults, after onset of symptoms.

If the first sample has been drawn later than the indicated intervals, a significant rise in titre may not regularly be detected.

Single (convalescent) samples

Current/recent pertussis infection is also indicated by an elevated PT IgG (see cut-off under Interpretation) in convalescent samples, defined as a sample drawn after onset of symptoms

- ≥3 weeks for unvaccinated children
- ≥10 days for vaccinated children and adults

NB

Vaccination within 1 year prior to sampling renders the serological diagnosis uncertain.

TEST PROCEDURE

Always test each patient sample in duplicates.

Always use the supplied ready-to-use positive and negative controls in duplicates at each test run.

All reagents should be used at room temperature (20-23° C).

We recommend preparing a blank with only substrate solution. This is simply done by using an empty well to which is added substrate solution when adding substrate solution to the other wells.

1. Prepare wash solution. (See under "Preparation of Reagents").
2. Prepare the amount of substrate solution sufficient for one day use. (See under "Preparation of Reagents").
3. Dilute patient sera 1:500 (in duplicate) in test tubes in two steps.
Step I: 10 µL serum + 190 µL sample dilution buffer.
Step II: 15 µL serum from step I + 360 µL sample dilution buffer.
4. Place the appropriate number of strips into frame.
5. To maximize the activity of the PERTUSSCAN PT IgG assay, always start procedures by washing each well four times. (See under "Washing Instructions").
6. Pipette 100 µL of each ready-to-use control as follows.
PT IgG positive control.
Negative control (labelled Green).
DO NOT DILUTE THE CONTROLS.
7. Pipette 100 µL of each freshly prediluted patient serum in duplicate.
8. Incubate for 60 minutes at 37° C.
9. Wash each well four times. (See under "Washing Instructions").
10. Pipette 100 µL of conjugate into the wells.
DO NOT DILUTE THE CONJUGATE
11. Incubate for 60 minutes at 37° C.
12. Wash each well four times. (See under "Washing Instructions").
13. Pipette 100 µL substrate solution into all microtitre wells.
14. Incubate for 30 minutes at 37° C.
15. Pipette 100 µL stop solution into all microtitre wells.
16. Read absorbance values at 405 nm.

Note: Before calculation of test results, the OD value of the blank well should be subtracted from all other wells.

VALIDATION OF TEST

Calculate the mean of duplicate wells for each control.

	Target OD (at 405 nm)	Acceptable range
Positive Controls	1.00	0.77 – 1.43
Negative Control	-	<0.3

CALCULATION OF RESULTS

To correct for positive control that does not meet the target value 1.0, a calculation has to be made according to:

$$\frac{\text{OD}_{\text{Sample}}}{\text{OD}_{\text{Positive Control}}}$$

The corrected OD from the equation is used for interpretation of the result.

INTERPRETATION OF PERTUSSCAN PT IgG

(See also "Collection of Samples").

Calculate the mean for all duplicate patient samples.

Paired samples

A doubling of absorbance between first and second sample represents a significant rise of antibodies.

A significant rise of anti-PT-IgG indicates current/recent infection.

Single (convalescent) samples

A sample, drawn 4-6 weeks after onset of symptoms in an unvaccinated child and after ≥ 10 days of symptoms in a vaccinated child or an adult, showing an IgG titre:

≥ 1.5 strongly indicates a current/recent infection (specificity 99.1%) ≥ 1.0 indicates a current/recent infection (specificity 97.2%)

NB

- The absorbance value of one sample from one test run to another may slightly differ. This is mainly due to slight difference in test runs with regard to pipetting technique, temperature in incubator and laboratory, and time factor at incubations.
- Some specimens may not be repeatedly reactive. Common causes are:
 - a. improper washing
 - b. use of reagents which passed expiry date,
 - c. cross-contamination ("pick ups") from neighbour positive microtitre wells.
- A titre ≥ 1.5 is diagnostic for current/recent pertussis only if no pertussis vaccine has been given within 12 months prior to blood sampling.
- An absorbance value above 0.3 indicates presence of antibody
- Elderly individuals (>60 years) could have no elevated PT IgG response to a current/recent infection but may then be diagnosed by an elevated FHA IgA (≥ 0.6) response (Pertusscan TRO).
- If further confirmation of an elevated absorbance value of IgG to PT at ≥ 1.0 - < 1.5 is indicated then Pertusscan TRO can be used:
 - current pertussis will be confirmed if also IgA to PT and/or FHA is elevated
- The cut-off limit of 1.5 corresponds to ≥ 110 EU/mL against the US FDA standard Lot 3
The cut-off value of $\geq 1,0$ corresponds to ≥ 70 EU/mL
The cut-off value of 0.3 corresponds to 18 EU/mL

Pertusscan PT IgG test is controlled against NIBSC.

LIMITATIONS

The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used as an adjunct to clinical symptoms and the results of other available tests.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Table 1. **Clinical sensitivity and specificity.** A total of 159 frozen retrospective sera. The following table summarises the results:

Control and Disease groups	Total number	Positive Cut off OD ≥ 1.5	Positive Cut-off OD ≥ 1.0
PT IgG positive samples	52	43	51
Routine samples (non-respiratory infections)	107	1	3

Clinical sensitivity: 52 samples from patients diagnosed with Pertussis infection were tested for elevated PT IgG levels.

Cut-off OD ≥ 1.0 , sensitivity 51/52 = 98.1% 95% CI = 89.7% - 100%

Cut-off OD ≥ 1.5 , sensitivity 43/52 = 82.7% 95% CI = 69.7% - 91.8%

Clinical specificity: 107 Routine samples (non-respiratory infections) were tested.

Cut-off OD ≥ 1.0 , specificity 104/107 = 97.2% 95% CI = 92.0% - 99.4%

Cut-off OD ≥ 1.5 , specificity 106/107 = 99.1% 95% CI = 94.9% - 100%

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

Table 2. **Batch to batch variation** was determined by testing ten different samples in eight replicates on three different batches.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mean OD value	0.43	0.12	0.07	0.20	0.76	1	1.23	0.89	2.12	1.86
SD	0.02	0.01	0.01	0.01	0.07	0.03	0.12	0.06	0.04	0.13
% CV	3.8	8.6	9.2	6.9	8.7	2.6	9.9	6.6	2.1	6.9

Table 3. **Inter-assay precision** was determined by testing ten different samples in eight replicates at three separate occasions.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mean OD value	0.42	0.11	0.06	0.19	0.71	0.97	1.28	0.83	2.18	1.72
SD	0.01	0	0	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05	0.02
% CV	1.5	2.7	4.6	3.6	1.7	1.6	1.7	3.8	2.4	0.9

Table 4. **Intra-assay precision** was determined by testing ten different samples in eight replicates at one occasion.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mean OD value	0.42	0.11	0.06	0.2	0.72	0.98	1.3	0.86	2.15	1.7
SD	0.03	0	0	0.01	0.04	0.05	0.07	0.03	0.1	0.1
% CV	6.1	4.0	5.3	4.9	4.8	5.8	4.8	3.9	3.5	5.8












Troubleshooting

Problem:	Possible causes:	Solution:
Control values out of range.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incorrect temperature, timing or pipetting; reagents not mixed. 2. Cross contamination of controls. 3. Improper dilution. 4. Optical pathway not clean. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Check that the time and temperature was correct. See "Poor precision" below. Repeat test. 2. Pipette carefully. 3. Repeat test. 4. Check for dirt or air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread.
All test results negative.	<ol style="list-style-type: none"> 1. One or more reagents not added, or added in wrong sequence. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recheck procedure. Check for unused reagent. Repeat test.
All test results yellow.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contaminated buffers or reagents. 2. Washing solution contaminated. 3. Improper dilution of serum. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Check all solutions for turbidity. 2. Use clean container. Check quality of water solution used to prepare. 3. Repeat test.
Poor precision.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pipette delivery CV greater than 5%. 2. Serum or reagents not mixed sufficiently or not equilibrated to room temperature. 3. Reagent addition taking too long; inconsistency in timing intervals. 4. Optical pathway not clean. 5. Washing not consistent; trapped bubbles; washing solution left in the wells. 6. Improper pipetting. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Check calibration of pipette. Use reproducible technique. 2. Mix all reagents gently but thoroughly and equilibrate to room temperature. 3. Develop consistent uniform technique and use multi-tip device or auto dispenser to decrease time. 4. Check for air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread. 5. Check that all wells are filled and aspirated uniformly. Dispense liquid above level of reagent in well. After the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue. 6. Avoid air bubbles in pipette tips.

REFERENCES

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons \leq 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt C-R, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1781–1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Explanation of symbols.

	Batch code
	Catalogue number
	Use-by date
	Temperature limit
	Biological risks
	Consult instructions for use
	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Warning
	Contains sufficient for 96 tests
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive.

Ag	Antigen (coated strips)
DIL	Sample dilution buffer
WASHBUF 40x	Wash buffer 40 x concentrated
CONTROL -	PT IgG negative serum
CONTROL + PT IgG	PT IgG positive serum
CONJ PT IgG	PT IgG conjugate
SUBSBUF	Substrate buffer
SUBS TAB pNPP	Substrate tablets
SOLN STOP	Stop solution (sodium hydroxide, 0.4 M)

PERTUSSCAN PT IgG

ELISA pour la détection des IgG dirigées contre la toxine de Bordetella Pertussis (PT) dans le sérum
(Réf. PERT- PTG2)

Barrettes de microtitration (12x8), 96 puits.
Conserver la trousse entre +2 °C et +8 °C.
Pour le diagnostic in vitro uniquement.

UTILISATION PRÉVUE DU TEST

Le Pertusscan PT IgG est un test ELISA (méthode immunoenzymatique) destiné à la détection des anticorps IgG dirigés contre la toxine de *Bordetella pertussis* (PT) dans les échantillons de sérum. Le test est conçu pour déterminer l'existence d'une infection actuelle/récurrente.

L'analyse ne doit être réalisée que par du personnel de laboratoire qualifié.
Pour le diagnostic in vitro uniquement.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La coqueluche, également nommée « toux des cent jours », est une infection bactérienne contagieuse causée par la bactérie *Bordetella pertussis*.

Les symptômes sont initialement modérés (similaires à un simple rhume), mais se transforment en violentes quintes de toux dont le paroxysme évoque le chant du coq chez le nourrisson et l'enfant lors de l'aspiration d'air après la toux. La toux dure environ six semaines avant la rémission. La prévention par la vaccination est de première importance car le traitement ne présente que peu de bénéfices cliniques pour la personne infectée. Cependant, les antibiotiques diminuent la durée de contagiosité et sont ainsi recommandés dans de nombreux pays. La toxine pertussique (PT) a une importance significative dans la pathogénie de la coqueluche. Il s'agit d'une véritable exotoxine qui est responsable de nombreux effets physiologiques, immunologiques et pharmacologiques. En outre, la toxine pertussique est très spécifique de *B. pertussis* à la différence d'autres exotoxines des espèces *Bordetella*. La sérologie avec détermination des IgG anti-PT s'est avérée particulièrement utile pour le diagnostic tardif des grands enfants et des adultes.

PRINCIPE DU TEST

Le test se compose de barrettes de microtitration recouvertes de toxine pertussique (PT), hautement purifiée, comme antigène. Chez les personnes infectées, les anticorps anti-PT se lient à leur antigène. La phosphatase alcaline conjuguée à un anticorps anti-IgG humaine se lie aux anticorps humains fixés à l'antigène. Quand le substrat est ajouté, une couleur jaune se développe : son intensité (lue dans un photomètre) est proportionnelle à la quantité d'anticorps.

MATÉRIEL FOURNI

Une plaque de barrettes de puits de microtitration (12x8), recouverts d'antigène de PT, emballée dans un sachet en aluminium avec produit déshydratant.

Contrôles

Contrôle positif, IgG anti-PT. Prêt à l'emploi.

1 flacon de 1,5 ml, solution bleue.

Contrôle négatif, IgG anti-PT (étiquette verte). Prêt à l'emploi.

1 flacon de 4,0 ml, solution bleue.

Tampon de dilution des échantillons. Prêt à l'emploi.

2 flacons de 25 ml, solution bleue.

Tampon de lavage.

1 flacon de 35 ml, concentré 40 x

Conjugué

Conjugué anti-IgG humaine. Prêt à l'emploi.

2 flacons de 6,0 ml, solution orange.

Pastilles de substrat.

1 barrette contenant 6 x 1 pastille.

Tampon de substrat.

1 flacon de 30 ml.

Solution d'arrêt.

1 flacon de 30 ml.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Lecteur de microplaques avec filtre de 405 nm.
- Pipettes de précision avec embouts jetables.
- Laveur de plaque pour les barrettes de puits, papier absorbant, tubes à essai et chronomètre.
- Module d'incubation ou incubateur (37 °C).
- Récipient non métallique pour la préparation de la solution de substrat.

RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant de les utiliser.

Tampon de dilution des échantillons. Contient une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et 0,09 % d'azide de sodium. Prêt à l'emploi.

Tampon de lavage, concentré 40 x. 29 % de chlorure de sodium, 2 % de Tween 20 et 0,09 % d'azide de sodium. Diluer avant utilisation.

Contrôles

Un sérum humain positif pour les IgG anti-PT et un sérum humain négatif pour les IgG anti-PT. Tous les sérums ont été testés et se sont avérés négatifs pour l'antigène AgHBs et les anticorps anti-VIH et anti-VHC. Les deux contrôles sont prêts à l'emploi.

Le conjugué contient des anticorps de chèvre anti-IgG humaine conjugué avec de la phosphatase alcaline.

Prêt à l'emploi.

Pastilles de substrat. P-nitrophényl phosphate, 5 mg/pastille.

Attention ! Tout contact avec un métal doit être évité.

Tampon de substrat. Contient de la diéthanolamine à 1 M et du chlorure de magnésium à 0,5 mM.

Prêt à l'emploi.

Solution d'arrêt. Contient de l'hydroxyde de sodium à 0,4 M, de l'EDTA, du tampon carbonate (pH >10). Éviter tout contact du réactif avec la peau. Prêt à l'emploi.

SÉCURITÉ ET PRÉCAUTIONS

Généralités

Les échantillons de sérum à analyser peuvent contenir des agents infectieux et doivent être manipulés en conséquence.

Ne pas pipeter à la bouche, ne pas fumer, manger ou boire dans les zones où les échantillons et les réactifs de la trousse sont manipulés.

On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le coffret sur demande auprès d'Euro Diagnostica.

Plaque ELISA

Les barrettes de microtitration doivent être manipulées avec précaution. Pour éviter de contaminer les puits, ne jamais toucher les barrettes avec les doigts. Pipeter avec précaution pour éviter de gratter l'intérieur du puits. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les puits une fois le pipetage terminé. Si des bulles d'air sont présentes, les éliminer en tapotant doucement sur le support de barrettes.

Contrôle positif

Contient du sérum humain positif pour les IgG anti-PT. Il doit être considéré comme potentiellement infectieux. Manipuler avec précaution. Produit testé et avéré négatif pour l'antigène AgHBs et les anticorps anti-VIH et anti-VHC.

Contrôle négatif

Contient du sérum humain négatif pour les IgG anti-PT. Il devra être considéré comme potentiellement infectieux. Manipuler avec précaution. Produit testé et avéré négatif pour l'antigène AgHBs et les anticorps anti-VIH et anti-VHC.

Conjugué, tampon diluant échantillon

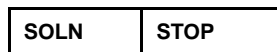
Contient du matériau biologique. Manipuler avec précaution.

Solution d'arrêt

Contient de l'hydroxyde de sodium à 0,4 M. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas d'éclaboussure, il faut l'éponger avec une grande quantité d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.



Attention



Contient de l'hydroxyde de sodium

H315:	Provoque une irritation cutanée.
H319:	Provoque une sévère irritation des yeux.
P264:	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage
P302+352:	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P305+351 +338:	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P332+313:	En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
P337+313	Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin..

Tampon de substrat

Contient 9,7% de la diéthanolamine.



SUBSBUF

Attention

Contient de la diéthanolamine

- H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage
P305+351
+338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337+313 Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Étant donné qu'aucune méthode de dépistage ne peut garantir complètement l'absence du VIH, du VHC, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux, les échantillons et les réactifs d'origine humaine doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.

Les Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Centre de prévention et de contrôle de maladies) et les National Institutes of Health (NIH, Institut national de santé) recommandent de traiter les agents potentiellement infectieux avec précaution, conformément au niveau de biosécurité 2.

CONDITIONS DE CONSERVATION

Généralités

Toujours conserver la trousse d'analyse et son contenu entre 2 °C et 8 °C.

La trousse d'analyse et son contenu doivent être amenés à température ambiante avant de les utiliser.

NE PAS UTILISER LES TROUSSES OU LEUR COMPOSANTS APRÈS LEUR DATE DE PÉREMPTION.

NE PAS MÉLANGER LES RÉACTIFS AYANT DES NUMÉROS DE LOT DIFFÉRENTS.

Solution de substrat

La solution de substrat préparée doit être utilisée le jour même.

Conserver dans l'obscurité, à température ambiante (20-23 °C).

Solution de lavage

Utiliser la solution de lavage préparée dans les 3 semaines. Conserver à température ambiante (20-23 °C).

Barrettes de microtitration

Retirer du sachet en aluminium uniquement le nombre de barrettes nécessaires pour l'analyse, puis le refermer avec soin. Conserver entre 2 °C et 8 °C.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant de les utiliser.

Solution de lavage

Diluer 1 flacon du tampon de lavage (35 ml) avec 1400 ml d'eau distillée. La quantité de solution de tampon de lavage ainsi préparée est suffisante pour 12 barrettes de microtitration ; elle est stable pendant 3 semaines à 20-23 °C.

Solution de substrat

Préparer uniquement la quantité nécessaire pour une journée d'utilisation (100 µl/puits).
1 pastille de substrat dissoute dans 5 ml de solution de substrat.

Attention ! La solution de substrat est stable pendant 1 jour. Conserver la solution préparée dans l'obscurité, sans dépasser la température ambiante.

INSTRUCTIONS DE LAVAGE

Toujours démarrer la procédure du test en lavant chaque puits quatre fois.

Suivre attentivement les instructions de lavage car un lavage incomplet peut compromettre le résultat du test.

Le lavage peut être réalisé soit manuellement, soit avec un laveur automatique de plaque de microtitration.

Lavage à l'aide d'un laveur automatique de plaque de microtitration

Si vous utilisez un laveur automatique de plaque de microtitration, vérifier que le contenu de tous les puits est aspiré correctement et que le tampon de lavage est bien distribué jusqu'au bord supérieur de chaque puits lors de chaque cycle de lavage. Le laveur doit être programmé pour effectuer 4 cycles de lavage.

Réaliser immédiatement l'étape de distribution du réactif suivant.

Lavage manuel

1. Remplir tous les puits avec 0,3 ml de solution de lavage.
2. Laisser les puits remplis pendant au moins 30 secondes.
3. Vider le contenu des puits en retournant la plaque de microtitration à l'envers et en la secouant d'un bref mouvement vertical.
4. Ce cycle de lavage (1, 2 et 3) doit être effectué 4 fois.
5. Déposer la plaque retournée sur du papier absorbant et tapoter fermement la plaque afin d'éliminer le reste de solution de lavage des puits.
6. Réaliser immédiatement l'étape de distribution du réactif suivant.

Ne pas gratter l'intérieur du puits.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Le test Pertusscan PT IgG est conçu pour être utilisé avec du sérum. Manipuler comme étant potentiellement infectieux. Éviter d'utiliser des sérums ictériques, lipémiques ou hémolysés.

Les sérums inactivés par la chaleur peuvent donner lieu à des réactions non spécifiques et ne doivent pas être utilisés.

Conserver le sérum entre 2 °C et 8 °C si le test doit être réalisé dans les cinq jours suivant le prélèvement. Si les échantillons doivent être conservés pendant plus longtemps, les conserver à une température inférieure ou égale à -20 °C. Ne pas utiliser de congélateur sans givre car les échantillons risqueraient d'être soumis à des cycles de congélation-décongélation, ce qui dégraderait les anticorps. Les échantillons qui ne sont pas conservés correctement ou qui sont soumis à de multiples cycles de congélation-décongélation peuvent produire des résultats erronés.

Le CLSI donne des recommandations sur la conservation des échantillons de sang (document H18A, Procédures standard approuvées pour la manipulation et le traitement des échantillons de sang, 1990).

Échantillons appariés

La méthode la plus fiable de diagnostic d'une coqueluche actuelle/récurrente consiste à démontrer une augmentation significative (= doublement de la valeur d'absorbance) de la titration d'IgG entre l'échantillon correspondant à l'infection aiguë et l'échantillon correspondant à la convalescence.

Un échantillon correspondant à l'infection aiguë est défini comme étant prélevé dans un délai :

de 2 à 3 semaines pour les enfants non vaccinés

< 7 jours pour les enfants et les adultes vaccinés, après la survenue des symptômes.

Si le premier échantillon a été prélevé après le délai indiqué, il est possible qu'une hausse significative de la titration ne soit pas détectée avec régularité.

Échantillons uniques (en convalescence)

Une coqueluche actuelle/récurrente est également indiquée par un taux élevé d'IgG anti-PT (voir le seuil dans la section « Interprétation ») dans l'échantillon d'un patient convalescent, défini comme un échantillon prélevé après la survenue des symptômes, dans un délai :

- ≥ 3 semaines pour les enfants non vaccinés
- ≥ 10 jours pour les enfants et les adultes vaccinés

NB

Si la vaccination a eu lieu dans un délai de 1 an avant le prélèvement, le diagnostic sérologique est incertain.

PROCÉDURE DU TEST

Toujours analyser chaque échantillon patient en double.

Toujours utiliser les contrôles positif et négatif fournis et prêts à l'emploi, en double, pour chaque série.

Tous les réactifs doivent être utilisés à température ambiante (20-23 °C).

Nous recommandons de préparer un blanc de réactif avec de la solution de substrat uniquement. Pour cela, il suffit d'utiliser un puits vide auquel la solution de substrat est ajoutée lors de l'ajout de la solution de substrat dans les autres puits.

1. Préparation la solution de lavage. (Consulter la section « Préparation des réactifs ».)
2. Préparer la quantité de solution de substrat nécessaire à une journée d'utilisation. (Consulter la section « Préparation des réactifs ».)
3. Diluer les sérums patients au 1/500 (en double) dans des tubes à essai en deux étapes.
Étape 1 : 10 µl de sérum + 190 µl de tampon de dilution des échantillons.
Étape 2 : 15 µl de sérum de l'étape 1 + 360 µl de tampon de dilution des échantillons.
4. Placer le nombre approprié des barrettes dans le support.
5. Pour maximiser l'activité du test PERTUSSCAN PT IgG, toujours démarrer les procédures en lavant chaque puits quatre fois. (Consulter la section « Instructions de lavage ».)
6. Pipeter 100 µl de chacun des contrôles prêts à l'emploi comme suit.
Contrôle positif, IgG anti-PT.
Contrôle négatif (étiquette verte).
NE PAS DILUER LES CONTRÔLES.
7. Pipeter 100 µl de chacun des sérums patients fraîchement dilués, en double.
8. Incuber durant 60 minutes à 37 °C.
9. Laver chaque puits quatre fois. (Consulter la section « Instructions de lavage ».)
10. Pipeter 100 µl de conjugué dans les puits.
NE PAS DILUER LE CONJUGUÉ.
11. Incuber durant 60 minutes à 37 °C.
12. Laver chaque puits quatre fois. (Consulter la section « Instructions de lavage ».)
13. Pipeter 100 µl de solution de substrat dans tous les puits de microtitration.
14. Incuber durant 30 minutes à 37 °C.
15. Pipeter 100 µl de solution de substrat dans tous les puits de microtitration.
16. Lire les valeurs d'absorbance à 405 nm.

Remarque : Avant de calculer les résultats du test, la valeur de la DO du puits de blanc de réactif doit être soustraite de tous les autres puits.

VALIDATION DU TEST

Calculer la moyenne des puits en double pour chaque contrôle.

	DO cible (à 405 nm)	Plage acceptable
Contrôles positifs	1,00	0,77 – 1,43
Contrôle négatif	-	<0,3

CALCUL DES RÉSULTATS

Pour effectuer une correction si le contrôle positif ne donne pas la valeur cible de 1,0, un calcul doit être effectué selon l'équation suivante :

$$\frac{\text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{contrôle positif}}}$$

La DO corrigée avec cette équation est utilisée pour l'interprétation du résultat.

INTERPRÉTATION DU TEST PERTUSSCAN PT IgG

(Consulter également la section « Prélèvement des échantillons ».)

Calculer la moyenne de tous les échantillons patients en double.

Échantillons appariés

Un doublement de l'absorbance entre le premier et le deuxième échantillon représente une augmentation significative des anticorps.

Une augmentation significative des IgG anti-PT indique une infection actuelle/récurrente.

Échantillons uniques (en convalescence)

Un échantillon, prélevé 4 à 6 semaines après la survenue des symptômes pour un enfant non vacciné et après un délai ≥ 10 jours de symptômes pour un enfant ou un adulte vacciné, présentant une titration en IgG :

$\geq 1,5$ indique fortement une infection actuelle/récurrente (spécificité de 99,1 %)
 $\geq 1,0$ indique une infection actuelle/récurrente (spécificité de 97,2 %)

NB

- La valeur d'absorbance d'un échantillon peut varier légèrement d'une série à l'autre. Ceci est dû principalement à de légères différences entre les séries quant à la technique de pipetage, à la température dans l'incubateur et le laboratoire, et au facteur temps pour les incubations.
- Certains échantillons peuvent ne pas être réactifs de façon répétée. Les causes habituelles sont :
 - a. lavage incorrect,
 - b. utilisation de réactifs périmés,
 - c. contamination croisée avec les puits de microtitration positifs voisins.
- Une titration $\geq 1,5$ correspond à un diagnostic de coqueluche actuelle/récurrente uniquement si aucun vaccin contre la coqueluche n'a été administré dans les 12 mois antérieurs au prélèvement de l'échantillon sanguin.
- Une valeur d'absorbance supérieure à 0,3 indique la présence d'anticorps.
- Les personnes âgées (> 60 ans) peuvent ne pas présenter d'augmentation de la réponse des IgG anti-PT à une infection actuelle/récurrente, mais peuvent alors être diagnostiquées par une augmentation de la réponse des IgA anti-FHA ($\geq 0,6$) (Pertusscan TRO).
- Si une confirmation supplémentaire d'une valeur d'absorbance élevée pour les IgG anti-PT $\geq 1,0$ et $< 1,5$ est indiquée, il est possible d'utiliser la trousse Pertusscan TRO :
 - une coqueluche actuelle sera également confirmée si les IgA anti-PT et/ou anti-FHA sont également élevées.
- Le seuil limite de 1,5 correspond à une titration ≥ 110 UE/ml par comparaison avec le lot 3 de l'étalon de la FDA des États-Unis.
Le seuil de $\geq 1,0$ correspond à ≥ 70 UE/ml.
Le seuil de 0,3 correspond à 18 UE/ml.

Le test Pertusscan PT IgG est contrôlé par rapport au NIBSC.

LIMITES

Le test ne doit pas servir de base unique pour décider un traitement clinique, mais il doit être utilisé en combinaison avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres tests disponibles.

PERFORMANCES

Tableau 1. **Sensibilité et spécificité clinique.** Au total, 159 échantillons de sérum congelé. Le tableau suivant résume les résultats :

Groupes de contrôle et de maladie	Nombre total	Seuil positif DO $\geq 1,5$	Seuil positif DO $\geq 1,0$
Échantillons positifs, IgG anti-PT	52	43	51
Échantillons de routine (infections non respiratoires)	107	1	3

Sensibilité clinique : 52 échantillons de patients avec un diagnostic de coqueluche ont été testés pour déterminer un taux élevé d'IgG anti-PT.

Seuil de DO $\geq 1,0$, sensibilité 51/52 = 98,1 % IC à 95 % = 89,7 % - 100 %

Seuil de DO $\geq 1,5$, sensibilité 43/52 = 82,7 % IC à 95% = 69,7% - 91,8 %

Spécificité clinique : 107 échantillons de routine (infections non respiratoires) ont été analysés.

Seuil de DO $\geq 1,0$, spécificité 104/107 = 97,2 % IC à 95 % = 92,0 % - 99,4 %

Seuil de DO $\geq 1,5$, spécificité 106/107 = 99,1 % IC à 95 % = 94,9 % - 100 %

L'intervalle de confiance (IC) à 95 % a été calculé en utilisant la méthode exacte.

Tableau 2. La **variation inter-lots** a été déterminée en analysant huit réplicats de dix échantillons différents avec trois lots différents.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO moyenne	0,43	0,12	0,07	0,20	0,76	1	1,23	0,89	2,12	1,86
Écart-type	0,02	0,01	0,01	0,01	0,07	0,03	0,12	0,06	0,04	0,13
CV (%)	3,8	8,6	9,2	6,9	8,7	2,6	9,9	6,6	2,1	6,9

Tableau 3. La **précision inter-série** a été déterminée en analysant huit réplicats de dix échantillons différents, à trois occasions différentes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO moyenne	0,42	0,11	0,06	0,19	0,71	0,97	1,28	0,83	2,18	1,72
Écart-type	0,01	0	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,02
CV (%)	1,5	2,7	4,6	3,6	1,7	1,6	1,7	3,8	2,4	0,9

Tableau 4. La **précision intra-série** a été déterminée en analysant huit réplicats de dix échantillons différents, à une seule occasion.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO moyenne	0,42	0,11	0,06	0,2	0,72	0,98	1,3	0,86	2,15	1,7
Écart-type	0,03	0	0	0,01	0,04	0,05	0,07	0,03	0,1	0,1
CV (%)	6,1	4,0	5,3	4,9	4,8	5,8	4,8	3,9	3,5	5,8












Dépannage

Problème :	Causes possibles :	Mesure corrective :
Les valeurs des contrôles se situent hors de leur intervalle.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Température, chronométrage ou pipetage incorrect ; réactifs non mélangés. 2. Contamination croisée des contrôles. 3. Dilution inappropriée. 4. Trajet optique sale. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier que la durée et la température sont correctes. Voir « Précision insuffisante » ci-dessous. Répéter le test. 2. Pipeter avec précaution. 3. Répéter le test. 4. Vérifier qu'il n'y a ni saletés, ni bulles d'air dans les puits. Essuyer la base et répéter la lecture.
Tous les résultats du test sont négatifs.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été ajoutés ou ils n'ont pas été ajoutés dans le bon ordre. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier à nouveau la procédure. Vérifier si un réactif n'a pas été utilisé. Répéter le test.
Tous les résultats du test sont jaunes.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tampons ou réactifs contaminés. 2. Solution de lavage contaminée. 3. Dilution incorrecte du sérum. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier la turbidité de toutes les solutions. 2. Utiliser un récipient propre. Vérifier la qualité de l'eau utilisée pour la préparation. 3. Répéter le test.
Précision insuffisante.	<ol style="list-style-type: none"> 1. CV du pipetage supérieur à 5 %. 2. Sérum ou réactifs non suffisamment mélangés ou non amenés à température ambiante. 3. L'ajout des réactifs a pris trop de temps ; différence quant aux intervalles de temps. 4. Trajet optique sale. 5. Lavage irrégulier ; présence de bulles ; solution de lavage restant dans les puits. 6. Pipetage incorrect. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier l'étalonnage de la pipette. Utiliser une technique reproductible. 2. Bien mélanger doucement tous les réactifs et les amener à température ambiante. 3. Développer une technique uniforme et homogène et utiliser un dispositif de pipetage à embouts multiples ou une pipette automatique pour diminuer le temps. 4. Vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits. Essuyer la base et répéter la lecture. 5. Vérifier que tous les puits sont remplis et aspirés uniformément. Distribuer le liquide au-dessus de niveau de réactif dans les puits. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant la barrette sur du papier absorbant. 6. Éviter la présence de bulles d'air dans les embouts des pipettes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons ≤ 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt C-R, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1781–1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Légende des symboles.

	Numéro de lot
	Référence de catalogue
	Date limite d'utilisation
	Limite de température
	Risques biologiques
	Consulter le mode d'emploi
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Attention
 96	Contenu suffisant pour 96 tests.
	Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Ag	Antigène (barrette recouverte d'antigène)
DIL	Tampon de dilution des échantillons
WASHBUF 40x	Tampon de lavage, concentré 40 x
CONTROL -	Sérum négatif pour les IgG anti-PT
CONTROL + TP IgG	Sérum positif pour les IgG anti-PT
CONJ TP IgG	Conjugué, IgG anti-PT
SUBSBUF	Tampon de substrat
SUBS TAB pNPP	Pastilles de substrat
SOLN STOP	Solution d'arrêt (hydroxyde de sodium à 0,4 M)

PERTUSSCAN PT IgG

ELISA para la detección de IgG frente a toxina de Bordetella Pertussis (PT)
en el suero
(N.º Cat. PERT- PTG2)

Tiras de microtitulación (12x8), 96 pocillos
Conservar el kit a +2-8° C
Exclusivamente para uso diagnóstico in vitro

USO PREVISTO DE LA PRUEBA

Pertusscan PT IgG es un ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos IgG frente a la toxina de Bordetella pertussis (PT) en muestras de suero. La prueba está pensada para la determinación de infección actual/reciente. El análisis deben realizarlo profesionales de laboratorio debidamente formados. "Para uso diagnóstico in vitro".

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Pertussis o tos ferina, es una enfermedad bacteriana contagiosa causada por la bacteria Bordetella pertussis.

Los síntomas son inicialmente leves (se parecen a los del resfriado común), pero avanzarán a ataques intensos de tos, que producen el sonido típico, de tono elevado, en bebés y niños infectados cuando inhalan aire después de toser. La etapa de tos dura aproximadamente seis semanas antes de remitir. La prevención mediante vacunación tiene la máxima importancia, porque el tratamiento supone poco beneficio clínico para la persona infectada. Sin embargo, los antibióticos reducen la duración del período infeccioso y, por tanto, se recomiendan en muchos países. La toxina Pertussis (PT) tiene una importancia significativa para la patogenia de la tos ferina. Se trata de una exotoxina real responsable de muchos efectos fisiológicos, inmunológicos y farmacológicos. Además, la toxina Pertussis es muy específica de B. pertussis, a diferencia de algunas otras exotoxinas de la especie Bordetella. La serología con determinación de IgG frente a PT ha demostrado ser especialmente útil para el diagnóstico más tardío de niños y adultos.

PRINCIPIO DEL TEST

El ensayo consta de tiras de microtítulos revestidas con PT muy purificada como antígeno. En personas infectadas, los anticuerpos producidos contra PT se unirán a su antígeno. El anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina se unirá a los anticuerpos humanos fijados al antígeno. Cuando se añade el sustrato, se desarrolla un color amarillo, cuya intensidad (leída en un fotómetro) es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Un marco con pocillos de tiras de microtítulos (12x8) revestidas con antígeno de PT, envasado en una bolsa de papel de aluminio con desecante.

Controles

Control positivo de IgG frente a PT Listo para usar

1 vial con 1,5 ml de solución azul

Control negativo de IgG frente a PT (marcado en verde) Listo para usar

1 vial con 4,0 ml de solución azul

Tampón de dilución de la muestra, Listo para usar

2 viales con 25 ml de solución azul

Tampón de lavado

1 vial con 35 ml, concentrado 40 x

Conjugado

Conjugado anti-IgG humana Listo para usar

2 viales con 6,0 ml de solución naranja

Comprimidos de sustrato

1 tira con 6 comprimidos

Tampón de sustrato

1 vial con 30 ml

Solución de parada

1 vial con 30 ml

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de microplacas con filtro de 405 nm.
- Pipetas de precisión con puntas desechables.
- Lavador para tiras, tejido absorbente, tubos y un temporizador.
- Bloques de incubación o incubador (37°C).
- Recipiente no metálico para la preparación de la solución de sustrato.

REACTIVOS

Todos los reactivos deben haber alcanzado la temperatura ambiente al utilizarse.

Tampón de dilución de la muestra, Contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS), azida sódica al 0,09% Listo para usar.

Tampón de lavado concentrado 40 x Cloruro sódico al 29%, Tween 20 al 2% y azida sódica al 0,09%. Diluir antes de su uso.

Controles

Un suero humano positivo para IgG frente a PT y un suero humano negativo para IgG frente a PT. Todos los sueros se han estudiado y han dado negativo para HBsAg y anticuerpos frente a VIH y VHC. Los dos controles están listos para su uso.

El conjugado contiene anticuerpos de carnero anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina.

Listo para usar.

Comprimidos de sustrato. P-Nitrofenil fosfato, 5 mg/comprimido.

Por favor, tenga en cuenta que Debe evitarse el contacto con el metal.

Tampón de sustrato. Contiene dietanolamina 1M y cloruro de magnesio 0,5 mM.

Listo para usar.

Solución de parada. Contiene hidróxido sódico 0,4 M, EDTA, tampón carbonato (pH > 10). No permita que el reactivo entre en contacto con la piel. Listo para usar.

SEGURIDAD Y PRECAUCIONES

Generales

Las muestras de suero a estudiar podrían contener agentes infecciosos y deben manejarse en consecuencia.

No pipetee con la boca, fume, coma ni beba en áreas en las que se manipulen muestras o reactivos del kit.

Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.

Placa de ELISA

Las tiras de microtítulos deben manipularse con precaución. Para evitar la contaminación de los pocillos, nunca toque la parte superior de las tiras con los dedos. Pipetee con cuidado para evitar raspar la parte interior del pocillo. Compruebe si hay burbujas de aire en los pocillos después de terminar de pipetear. Si las hay, elimínelas golpeando suavemente el soporte de las tiras.

Control positivo

Contiene suero humano positivo para IgG frente a PT. Debe considerarse potencialmente infeccioso. Manipular con precaución. Ha dado negativo para anticuerpos frente a VIH y VHC y también frente a HbSAg.

Control negativo

Contiene suero humano negativo para IgG frente a PT. Debe considerarse potencialmente infeccioso. Manipular con precaución. Ha dado negativo para anticuerpos frente a VIH y VHC y también frente a HbSAg.

Conjugado, tampón diluyente de muestra

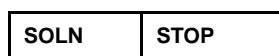
Contiene material biológico. Manipular con precaución.

Solución de parada

Contiene hidróxido sódico 0,4M. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Los vertidos deben fregarse con cantidades copiosas de agua. Si se produce contacto con la piel o los ojos, irrigue con agua y busque asistencia médica inmediatamente.



Atención



Contiene hidróxido sódico

- H315: Provoca irritación cutánea.
 H319: Provoca irritación ocular grave.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P302+352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
 P305+351 +338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando..
 P332+313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
 P337+313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico..

Tampón de sustrato

Contiene 9,7% dietanolamina.



Atención

SUBSBUF

Contiene dietanolamina.

- H319: Provoca irritación ocular grave.
- P264: Lávese bien las manos después de manipular.
- P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
- P305+351 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando..
- +338: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico..
- P337+313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico..

Como ningún método de prueba puede ofrecer la tranquilidad absoluta de que están ausentes el VIH, el VHC, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos de origen humano deben manipularse como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos.

Los Centers for Disease Control and Prevention y los National Institutes of Health recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se manipulen en un nivel 2 de Bioseguridad.

INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Generales

Conserve siempre el kit de prueba y su contenido a 2-8° C.

El kit de prueba y su contenido deben haber alcanzado la temperatura ambiente antes del uso.

NO UTILICE KITS O COMPONENTES QUE HAYAN SOBREPASADO LA FECHA DE CADUCIDAD.

NO MEZCLE REACTIVOS CON DIFERENTES NÚMEROS DE LOTE.

Solución de sustrato

La solución de sustrato preparada debe usarse en el mismo día.

Mantener en la oscuridad a temperatura ambiente (20-23° C).

Solución de lavado

Utilice la solución de lavado en el plazo de 3 semanas. Conservar a temperatura ambiente (20-23° C).

Tiras de microtítulos

Extraiga sólo el número de tiras necesarias para las pruebas, volviendo a sellar cuidadosamente la bolsa de lámina de aluminio. Conservar a 2-8° C.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos deben haber alcanzado la temperatura ambiente al utilizarse.

Solución de lavado

Diluya un frasco de tampón de lavado (35 ml) en 1.400 ml de agua destilada. La cantidad preparada de solución de tampón de lavado es suficiente para 12 tiras de microtítulos y es estable durante 3 semanas a 20-23° C.

Solución de sustrato

Prepare solo la cantidad suficiente para un día de uso (100 µl/pocillo).

1 comprimido de sustrato en 5 ml de solución de sustrato.

Por favor, tenga en cuenta que La solución de sustrato es estable durante 1 día.

Mantenga la solución preparada en la oscuridad y a una temperatura no superior a la temperatura ambiente.

INSTRUCCIONES DE LAVADO

Comience siempre el procedimiento de prueba lavando cada pocillo cuatro veces.

Siga estrechamente las instrucciones de lavado, porque un lavado incompleto podría poner en peligro el resultado de la prueba.

El lavado puede realizarse mediante un lavador de placas de microtítulos automático o bien manualmente.

Lavado mediante un equipo automático de lavado de microplacas

Cuando utilice un equipo automático de lavado de placas, compruebe que se pueden aspirar completamente todos los pocillos y que el tampón de lavado es dispensado correctamente alcanzando el borde de cada pocillo durante cada ciclo de lavado. Debe programarse la lavadora para que ejecute 4 ciclos de lavado.

Continúe inmediatamente con el siguiente paso de adición de reactivo.

Lavado manual

1. Rellene todos los pocillos con 0,3 ml de solución de lavado.
2. Deje que los pocillos llenos reposen durante al menos 30 segundos.
3. Vacíe los pocillos volcando la microplaca hacia abajo seguido de un firme movimiento vertical.
4. El ciclo de lavado (1, 2 y 3) debe realizarse 4 veces.
5. Vuelque la placa sobre papel absorbente y sacuda firmemente para eliminar la solución de lavado residual de los pocillos.
6. Continúe inmediatamente con el siguiente paso de adición de reactivo.

No rasque el interior del pocillo.

RECOGIDA DE MUESTRAS

El ensayo Pertusscan PT IgG está pensado para uso con suero. Manipule como si fuera capaz de transmitir agentes infecciosos. Evite el uso de sueros ictericos, lipémicos o hemolizados.

Los sueros inactivados al calor pueden dar reactividades inespecíficas y no deben utilizarse. Conserve el suero entre 2 y 8° C si las pruebas se van a realizar en el plazo de cinco días.

Si las muestras se van a conservar durante períodos más largos, conservar a una temperatura de -20° C o inferior. No utilice un congelador sin escarcha, porque puede permitir que las muestras pasen por ciclos de congelación-descongelación y degraden el anticuerpo. Las muestras conservadas de forma inadecuada o sometidas a múltiples ciclos de congelación-descongelación podrían dar resultados erróneos.

El CLSI proporciona recomendaciones para la conservación de muestras de sangre (Procedimientos estándar aprobados para la manipulación y el procesamiento de las muestras de sangre - Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Muestras emparejadas

El método más fiable para diagnosticar una infección por pertussis actual/reciente es demostrar un aumento significativo de los títulos (= aumento al doble del valor de absorbancia) en la IgG. entre la muestra aguda y la de convalecencia.

Se define una muestra aguda como la que se extrae dentro del plazo de:
2-3 semanas en niños no vacunados

<7 días en niños y adultos vacunados, después de la aparición de los síntomas.

Si la primera muestra se ha extraído más tarde de los intervalos indicados, podría no detectarse normalmente un aumento significativo de los títulos.

Muestras únicas (en convalecencia)

También indica infección actual/reciente por pertussis una IgG PT elevada (véase el corte en el apartado de interpretación) en muestras de convalecencia, definida como una muestra extraída después de la aparición de los síntomas.

- ≥ 3 semanas en niños no vacunados
- ≥ 10 días en niños vacunados y adultos

Nota

La vacunación dentro del año anterior a la toma de la muestra hace que el diagnóstico serológico sea incierto.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Estudie siempre las muestras de cada paciente por duplicado.

Utilice siempre los controles positivos y negativos listos para usar en los duplicados en cada ejecución de la prueba.

Todos los reactivos deben emplearse a temperatura ambiente (20-23° C).

Recomendamos preparar un blanco con solución sólo de sustrato. Esto se realiza simplemente usando un pocillo vacío al que se añade solución de sustrato al añadir solución de sustrato a los otros pocillos.

1. Prepare solución de lavado. (Véase en "Preparación de los Reactivos").
2. Prepare la cantidad de solución de sustrato suficiente para un día de uso. (Véase en "Preparación de los Reactivos").
3. Diluya 1:500 los sueros de pacientes (por duplicado) en tubos de ensayo en dos pasos.
Paso I: 10 μ l de suero + 190 μ l de tampón de dilución de muestra.
Paso II: 15 μ l de suero del paso I + 360 μ l de tampón de dilución de muestra.
4. Coloque el número adecuado de tiras en el marco.
5. Para aumentar al máximo la actividad del ensayo PERTUSSCAN PT IgG, comience siempre los procedimientos lavando cada pocillo cuatro veces. (Véase en "Instrucciones de lavado").
6. Pipetee 100 μ l de cada control listo para usar, como sigue.
Control positivo de IgG frente a PT
Control negativo (marcado en verde).
NO DILUIR LOS CONTROLES.
7. Pipetear 100 μ l de cada suero de paciente recién prediluido por duplicado.
8. Incubar durante 60 minutos a 37°C.
9. Lavar cada pocillo cuatro veces. (Véase en "Instrucciones de lavado").
10. Pipetear 100 μ l de conjugado en los pocillos.
NO DILUIR EL CONJUGADO

11. Incubar durante 60 minutos a 37°C.
12. Lavar cada pocillo cuatro veces. (Véase en “Instrucciones de lavado”).
13. Pipetear 100 µl de solución de sustrato en todos los pocillos de microtítulos.
14. Incubar durante 30 minutos a 37°C.
15. Pipetear 100 µl de solución de parada en todos los pocillos de microtítulos.
16. Leer valores de absorbancia a 405 nm.

Nota: Antes del cálculo de los resultados de la prueba, debe sustraerse el valor de DO del pocillo blanco de los valores de todos los demás pocillos.

VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Calcule la media de los pocillos duplicados para cada control.

	DO objetivo (a 405 nm)	Intervalo aceptable
Controles positivos	1.00	0.77 – 1.43
Control negativo	-	<0.3

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Para corregir en caso de un control positivo que no cumpla el valor objetivo 1,0, tiene que realizarse un cálculo de acuerdo con:

$$\frac{DO_{\text{muestra}}}{DO_{\text{Control positivo}}}$$

La DO corregida de la ecuación se utiliza para la interpretación del resultado.

INTERPRETACIÓN DE PERTUSSCAN PT IgG

(Véase también “Recogida de muestras”).

Calcule la media de todas las muestras de pacientes duplicadas.

Muestras emparejadas

Un aumento al doble de la absorbancia entre la primera y la segunda muestra representa una elevación significativa de los anticuerpos.

Una elevación significativa de IgG anti-PT indica infección actual/reciente.

Muestras únicas (en convalecencia)

Una muestra extraída 4-6 semanas después de la aparición de los síntomas en un niño no vacunado y después de ≥ 10 días de síntomas en un niño vacunado o un adulto, que muestre un título de IgG:

$\geq 1,5$ indica fuertemente una infección actual/reciente (especificidad del 99,1%)
 $\geq 1,0$ indica una infección actual/reciente (especificidad del 97,2%)

Nota

- El valor de absorbancia de una muestra entre una ejecución de la prueba y otra podría diferir ligeramente. Esto se debe fundamentalmente a leves diferencias en las ejecuciones de la prueba con respecto a la técnica de pipeteado, la temperatura en el incubador y el laboratorio y el factor del tiempo en las incubaciones.
- Algunas muestras podrían no ser repetidamente reactivas. Algunas causas frecuentes son:
 - a. lavado inadecuado
 - b. uso de reactivos pasada la fecha de caducidad,
 - c. contaminación cruzada (“transportes”) de pocillos de microtítulos positivos vecinos.
- Un título $\geq 1,5$ es diagnóstico de infección actual/reciente por pertussis, sólo si no se ha administrado vacuna de pertussis dentro de los 12 meses previos a la toma de la muestra de sangre.
- Un valor de absorbancia por encima de 0,3 indica la presencia de anticuerpo
- Las personas ancianas (>60 años) podría no tener una respuesta de IgG PT elevada a una infección actual/reciente, pero podrían diagnosticarse mediante una respuesta de elevación de IgA en FHA ($\geq 0,6$) (Pertusscan TRO).
- Si está indicada más confirmación de un valor de absorbancia elevado de IgG a PT en $\geq 1,0$ - $< 1,5$, puede usarse Pertusscan TRO:
 - se confirmará la infección actual por pertussis si también la IgA frente a PT y/o la FHA están elevadas
- El límite de corte de 1,5 corresponde a ≥ 110 UE/ml frente al lote 3 de patrón de la FDA de EEUU
 El valor de corte de $\geq 1,0$ corresponde a ≥ 70 UE/ml
 El valor de corte de 0,3 corresponde a 18 UE/ml

La prueba de Pertusscan PT IgG está controlada frente a NIBSC.

LIMITACIONES

No debe emplearse la prueba como única base para las decisiones sobre terapia clínica, sino que debe emplearse como adyuvante a los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Tabla 1. **Sensibilidad y especificidad clínicas.** Un total de 159 sueros congelados retrospectivos. En la tabla siguiente se resumen los resultados:

Grupos control y con enfermedad	Número total	Corte Positivo, DO $\geq 1,5$	Corte positivo DO $\geq 1,0$
Muestras positivas de IgG frente a PT	52	43	51
Muestras de rutina (infecciones no respiratorias)	107	1	3

Sensibilidad clínica: Se estudiaron 52 muestras de pacientes diagnosticados de infección por Pertussis en cuanto a niveles elevados de IgG PT.

DO de corte $\geq 1,0$, sensibilidad 51/52 = 98.1% IC del 95% = 89,7 -100%

DO de corte $\geq 1,5$, sensibilidad 43/52 = 82,7% IC del 95% = 69,7% - 91,8%

Especificidad clínica: Se estudiaron 107 muestras de rutina (infecciones no respiratorias)

DO de corte $\geq 1,0$, especificidad 104/107 = 97,2% IC del 95% = 92,0% - 99,4%

DO de corte $\geq 1,5$, especificidad 106/107 = 99,1% IC del 95% = 94,9% - 100%

El intervalo de confianza (IC) del 95% se calculó usando el método exacto.

Tabla 2. Se determinó la **variación de lote a lote** estudiando diez muestras diferentes en ocho replicados en tres lotes diferentes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valor medio de DO	0.43	0.12	0.07	0.20	0.76	1	1.23	0.89	2.12	1.86
DE	0,02	0.01	0.01	0.01	0.07	0.03	0.12	0.06	0,04	0.13
% CV	3.8	8.6	9.2	6.9	8.7	2.6	9.9	6.6	2.1	6.9

Tabla 3. Se determinó la **precisión entre ensayos** estudiando diez muestras diferentes en ocho replicados en tres ocasiones separadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valor medio de DO	0.42	0.11	0.06	0.19	0.71	0.97	1.28	0.83	2.18	1.72
DE	0.01	0	0	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05	0.02
% CV	1.5	2.7	4.6	3.6	1.7	1.6	1.7	3.8	2.4	0.9

Tabla 4. Se determinó la **precisión intra-ensayo** estudiando diez muestras diferentes en ocho replicados en una ocasión.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valor medio de DO	0.42	0.11	0.06	0.2	0.72	0.98	1.3	0.86	2.15	1.7
DE	0.03	0	0	0.01	0.04	0.05	0.07	0.03	0.1	0.1
% CV	6.1	4.0	5.3	4.9	4.8	5.8	4.8	3.9	3.5	5.8

Solución de problemas

Problema:	Posibles causas:	Solución:
Valores control fuera de rango.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Temperatura, momento o pipeteado incorrectos; reactivos no mezclados. 2. Contaminación cruzada de los controles. 3. Dilución inadecuada. 4. Vía óptica no limpia. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Compruebe que el tiempo y la temperatura fueron correctos. Véase "Mala precisión" más abajo. Repita la prueba. 2. Pipetear con cuidado. 3. Repita la prueba. 4. Compruebe si hay suciedad o burbujas de aire en los pocillos. Limpie el fondo y vuelva a leer.
Todos los resultados de las pruebas son negativos.	<ol style="list-style-type: none"> 1. No se han añadido uno o más reactivos o se han añadido en una secuencia incorrecta. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vuelva a comprobar el procedimiento. Compruebe el reactivo no utilizado. Repita la prueba.
Todos los resultados de las pruebas son amarillos.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tampones o reactivos contaminados. 2. Solución de lavado contaminada. 3. Dilución inadecuada del suero. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Compruebe la turbidez de todas las soluciones. 2. Utilice un recipiente limpio. Compruebe la calidad de la solución de agua empleada para preparar. 3. Repita la prueba.
Mala precisión.	<ol style="list-style-type: none"> 1. CV de la administración de la pipeta mayor del 5% 2. Suero o reactivos no mezclados suficientemente o no equilibrados a temperatura ambiente. 3. La adición de reactivos está tardando demasiado; inconstancia en los intervalos de temporización. 4. Vía óptica no limpia. 5. Lavado no constante; burbujas Atrapadas; queda solución de lavado en los pocillos. 6. Pipeteado inadecuado. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Compruebe la calibración de la pipeta. Utilice una técnica reproducible. 2. Mezcle todos los reactivos de forma suave pero concienzuda y equilibre a temperatura ambiente. 3. Desarrolle una técnica uniforme constante y utilice un dispositivo de multipunta o un autodispensador para reducir el tiempo. 4. Compruebe si hay burbujas de aire en los pocillos. Limpie el fondo y vuelva a leer. 5. Compruebe que todos los pocillos se llenan y aspiran de manera uniforme. Dispense líquido por encima del nivel de reactivo en el pocillo. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando suavemente la tira sobre tejido absorbente. 6. Evite las burbujas de aire en las puntas de las pipetas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons \leq 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt C-R, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1781–1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Explicación de los símbolos

	Número de lote.
	Número de catálogo
	Fecha de caducidad.
	Rango de temperature.
	Riesgos biológicos
	Consulte las instrucciones de uso
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Fabricante
	Atención.
 96	Contenido suficiente para 96 pruebas.
	La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> .

Ag				Antígeno (tiras revestidas)
DIL				Tampón de dilución de la muestra
WASHBUF	40x			Tampón de lavado concentrado 40 x
CONTROL	-			Suero negativo para IgG frente a PT
CONTROL	+	PT	IgG	Suero positivo para IgG frente a PT
CONJ	PT	IgG		Conjugado de IgG frente a PT
SUBSBUF				Tampón de sustrato
SUBS	TAB	pNPP		Comprimidos de sustrato
SOLN	STOP			Solución de parada (hidróxido sódico, 0,4 M)

PERTUSSCAN PT IgG

ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen
Bordetella pertussis Toxin (PT) im Serum
(Bestell-Nr. PERT- PTG2)

Mikrotiterplatten-Streifen (12x8), 96 Wells
Kit bei +2-8 °C lagern.
Nur zur *in-vitro*-Diagnostik

VERWENDUNGSZWECK DES TESTS

Pertusscan PT IgG ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das *Bordetella pertussis*-Toxin (PT) in Serumproben. Der Test ist zum Nachweis einer aktuellen/frischen Infektion geeignet.

Die Untersuchung darf nur von ausgebildetem Laborpersonal durchgeführt werden.
"Nur zur *in-vitro*-Diagnostik".

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Pertussis bzw. Keuchhusten ist eine ansteckende bakterielle Erkrankung, die durch das Bakterium *Bordetella pertussis* ausgelöst wird.

Die Symptome sind anfänglich leicht (ähneln denen einer allgemeinen Erkältung), steigern sich aber zu schweren Hustenanfällen, welche bei infizierten Säuglingen und Kindern zu den namensgebenden "Keuch-Tönen" führen, die beim Einatmen nach der Hustenattacke entstehen. Das Hustenstadium hält ungefähr sechs Wochen an, bevor es allmählich abnimmt. Vorbeugung durch Impfung ist primär wichtig, da eine Behandlung der infizierten Person nur geringen klinischen Nutzen hat. Allerdings verringern Antibiotika die Dauer der Ansteckungsgefahr und werden daher in vielen Ländern empfohlen. Das Pertussis-Toxin (PT) ist für die Pathogenese des Keuchhustens von entscheidender Bedeutung. Es handelt sich um ein echtes Exotoxin, das für viele physiologische, immunologische und pharmakologische Auswirkungen verantwortlich ist. Darüber hinaus ist das Pertussis-Toxin im Gegensatz zu anderen Exotoxinen der Spezies *Bordetella* hoch-spezifisch für *B. pertussis*. Serologische Nachweise von IgG gegen PT haben sich als besonders hilfreich für eine späte Diagnose bei älteren Kindern und Erwachsenen erwiesen.

TESTPRINZIP

Der Test besteht aus Mikrotiterplatten-Streifen, die mit hoch gereinigtem PT als Antigen beschichtet sind. Bei infizierten Personen binden gegen PT gebildete Antikörper an dieses Antigen. Mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Anti-Human-IgG bindet an diese humanen Antikörper, die wiederum an das Antigen gekoppelt sind. Nach dem Hinzufügen von Substrat entwickelt sich eine gelbe Farbe, deren Intensität (gemessen mittels Photometer) der Menge an gebundenen Antikörpern proportional ist.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Ein Rahmen mit Mikrotiterplatten-Streifen (12x8 Wells) beschichtet mit PT-Antigen, verpackt mit Trockenmittel in einem Folienbeutel.

Kontrollen

PT IgG Positivkontrolle. Gebrauchsfertig

1 Fläschchen mit 1,5 ml, blaue Lösung

PT IgG Negativkontrolle (grün etikettiert). Gebrauchsfertig

1 Fläschchen mit 4,0 ml, blaue Lösung

Probenverdünnungspuffer. Gebrauchsfertig

2 Fläschchen mit 25 ml, blaue Lösung

Waschpuffer

1 Fläschchen mit 35 ml, 40-fach konzentriert

Konjugat

Anti-Human-IgG-Konjugat. Gebrauchsfertig

2 Fläschchen mit 6,0 ml, orange Lösung

Substrat-Tabletten

1 Streifen mit 6 x 1 Tablette

Substratpuffer

1 Fläschchen mit 30 ml

Stopplösung

1 Fläschchen mit 30 ml

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Meßgerät für Mikrotiterplatten mit einem Filter für 405 nm.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen
- Waschgerät für Streifen, saugfähige Papiertücher, Röhrchen und ein Kurzzeitwecker
- Heizblock oder Inkubator (37 C).
- Nicht-metallischer Behälter für die Zubereitung der Substratlösung.

REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht haben.

Probenverdünnungspuffer. Enthält Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), 0,09 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

Waschpuffer, 40-fach konzentriert. 29 % Natriumchlorid, 2 % Tween 20 und 0,09 % Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.

Kontrollen

Ein PT-IgG-positives Humanserum und ein PT-IgG-negatives Humanserum. Alle Seren sind negativ getestet in Bezug auf HBsAg sowie HIV- und HCV-Antikörper. Beide Kontrollen sind gebrauchsfertig.

Das Konjugat enthält Anti-Human-IgG von der Ziege, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase. Gebrauchsfertig.

Substrat-Tabletten. P-Nitrophenylphosphat, 5 mg/Tablette.

Bitte beachten! Kontakt mit Metall muss vermieden werden.

Substratpuffer. Enthält 1 M Diethanolamin und 0,5 mM Magnesiumchlorid. Gebrauchsfertig.

Stopplösung. Enthält 0,4 M Natriumhydroxid, EDTA, Karbonatpuffer (pH >10). Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden. Gebrauchsfertig.

SICHERHEITS- UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Allgemein

Die zu testenden Serumproben können infektiöse Stoffe enthalten und sollten dementsprechend behandelt werden.

Nicht mit dem Mund pipettieren und in Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien verwendet werden, nicht rauchen, essen oder trinken.

Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.

ELISA-Platte

Die Mikrotiterplatten-Streifen sollten vorsichtig behandelt werden. Um eine Kontamination der Wells zu vermeiden, die Streifenoberseite nie mit den Fingern berühren. Sorgfältig pipettieren, um die Innenseite der Wells nicht zu verkratzen. Nach dem Pipettieren die Wells auf Luftblasen hin kontrollieren. Vorhandene Luftblasen durch leichtes Klopfen gegen den Streifenhalter entfernen.

Positivkontrolle

Enthält menschliches Serum positiv für PT IgG. Es sollte als potenziell infektiös angesehen werden. Vorsichtig damit umgehen. Im Bezug auf HIV- und HCV-Antikörper sowie HBsAg als negativ befundet.

Negativkontrolle

Enthält menschliches Serum negativ für PT IgG. Es sollte als potenziell infektiös angesehen werden. Vorsichtig damit umgehen.. Im Bezug auf HIV- und HCV-Antikörper sowie HBsAg als negativ befundet.

Konjugat, Probenverdünnungspuffer

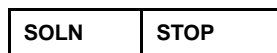
Enthält biologisches Material. Vorsichtig damit umgehen.

Stopplösung

Enthält 0,4 M Natriumhydroxid. Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttetes Material mit reichlich Wasser aufwischen. Bei Kontakt mit Haut oder Augen mit Wasser spülen und sofort in ärztliche Behandlung begeben.



Achtung



Enthält Natriumhydroxid

- H315: Verursacht Hautreizungen.
 H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P302+352: BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
 P305+351 +338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 P332+313: Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
 P337+313: Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Da kein Testverfahren die vollständige Gewissheit bieten kann, dass kein HIV, HCV, Hepatitis B-Virus oder andere Infektionserreger vorliegen, sollten Proben und Reagenzien humanen Ursprungs als potenziell infektiös behandelt werden.

Das „Center for Disease Control and Prevention“ und das „National Institutes of Health“ empfehlen, potenziell infektiöse Materialien nach "Biosafety Level 2" zu behandeln.

Substratpuffer

Enthält 9,7% Diethanolamin



SUBSBUF

Achtung

Enthält Diethanolamin

- H319: Verursacht schwere Augenreizung.
P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
P305+351 +338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P337+313: Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

HINWEISE ZUR LAGERUNG

Allgemein

Den Testkit und seinen Inhalt immer bei 2-8 °C aufbewahren.

Vor Gebrauch müssen Testkit und Inhalt Raumtemperatur erreicht haben.

KITS ODER KITKOMPONENTEN NACH DEM VERFALLSDATUM NICHT MEHR VERWENDEN.

REAGENZIEN MIT VERSCHIEDENEN CHARGENNUMMERN NICHT MISCHEN.

Substratlösung

Zubereitete Substratlösung muss am selben Tag verbraucht werden.

Dunkel bei Raumtemperatur lagern (20-23 °C).

Waschlösung

Zubereitete Waschlösung innerhalb von 3 Wochen aufbrauchen. Bei Raumtemperatur lagern (20-23 °C).

Mikrotiterplatten-Streifen

Entnehmen Sie nur die Anzahl an Streifen, die zum Testen benötigt werden. Die Aluminiumverpackung wieder sorgfältig verschließen. Bei 2-8 °C lagern.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht haben.

Waschlösung (40x)

1 Flasche Waschpuffer (35 ml) mit destilliertem Wasser verdünnen auf 1400 ml. Die zubereitete Menge an Waschpufferlösung reicht für 12 Streifen und ist 3 Wochen bei 20-23 °C stabil.

Substratlösung

Setzen Sie nur die Menge an, die für einen Tag benötigt wird (100 µl/Well).

1 Substrattablette wird aufgelöst mit 5 ml Substratpuffer.

Bitte beachten! Die Substratlösung ist nur 1 Tag stabil. Die zubereitete Lösung im Dunkeln und nicht höher als bei Raumtemperatur aufbewahren.

WASCHPROZEDUR

Die Testdurchführung immer mit viermaligem Waschen der Wells beginnen.

Die folgende Waschanleitung strikt beachten, da unzureichendes Waschen das Testergebnis verfälschen kann. Das Waschen kann entweder mit einem automatischen Mikrotiterplatten-Waschgerät oder manuell durchgeführt werden.

Waschen mit einem automatischen Mikrotiterplatten-Waschgerät

Bei der Verwendung eines automatischen Plattenwaschgeräts ist darauf zu achten, dass alle Wells vollständig abgesaugt werden und der Waschpuffer bei jedem Waschzyklus gleichmäßig auf jedes Well verteilt wird. Das Waschgerät sollte auf die Durchführung von vier Waschzyklen eingestellt sein.

Danach sofort mit der nächsten Reagenz-Zugabe weitermachen.

Manuelles Waschen

1. Jedes Well mit 0,3 ml Waschlösung auffüllen.
2. Die Wells mindestens 30 Sekunden lang stehen lassen.
3. Die Wells durch Umdrehen der Mikrotiterplatte ausleeren, gefolgt von einer kurzen kräftigen Abwärtsbewegung.
4. Diesen Waschzyklus (1, 2 und 3) viermal durchführen.
5. Die Platte umgedreht auf Papiertücher legen und fest ausklopfen, um die Reste der Waschlösung aus den Wells zu entfernen.
6. Danach sofort mit der nächsten Reagenz-Zugabe weitermachen.

Die Innenseite der Wells nicht zerkratzen.

PROBENENTNAHME, LAGERUNG

Der Pertusscan PT IgG-Test ist für den Einsatz von Serum vorgesehen. Proben möglichst so handhaben, als wären sie potenziell infektiös. Die Verwendung von ikterischen, lipämischen oder hämolytischen Seren vermeiden.

Hitzeinaktivierte Seren können unspezifisch reagieren und sollten daher nicht verwendet werden.

Serum bei 2-8 °C lagern, wenn es innerhalb von 5 Tagen getestet wird. Die Proben bei -20 °C oder darunter lagern, wenn sie für längere Zeit aufbewahrt werden sollen. Keinen Gefrierschrank mit "Abtauautomatik" verwenden, da die Proben dort Auftau-Einfrier-Zyklen unterworfen sein können, die zum Abbau der Antikörper führen.. Proben, die nicht richtig gelagert oder mehrfachen Auftau-Einfrier-Zyklen unterworfen sind, können falsche Ergebnisse liefern.

Das CLSI hat Empfehlungen zur Lagerung von Blutproben herausgebracht ("Approved Standard Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens", H18A, 1990).

Gepaarte Proben

Die zuverlässigste Methode eine aktuelle/frische Pertussis-Infektion zu diagnostizieren, ist der Nachweis einer signifikanten Titererhöhung von IgG (= Verdoppelung des Extinktionswerts) zwischen der Akut- und Rekonvaleszenzprobe.

Eine Akutprobe ist definiert als eine Entnahme innerhalb von:

- 2-3 Wochen bei nicht geimpften Kindern oder
- <7 Tage für geimpfte Kinder und Erwachsene, nach Einsetzen der Symptome.

Wenn die erste Probe nach den oben genannten Zeitpunkten entnommen wurde, kann dieser signifikante Titeranstieg möglicherweise nicht immer nachgewiesen werden.

Einzel- (Rekonvaleszenz-) Proben

Eine aktuelle/frische Pertussis-Infektion wird ebenfalls durch ein erhöhtes PT IgG (siehe Cut-off unter "Interpretation") in Rekonvaleszenzproben angezeigt;

diese sind definiert als eine Probe, die

- ≥ 3 Wochen bei nicht geimpften Kindern, oder
- ≥ 10 Tage bei geimpften Kindern und Erwachsenen nach dem Einsetzen der Symptome entnommen wurde.

NB

Impfungen innerhalb eines Jahres vor einer Probenentnahme führen zu zweifelhaften serologischen Diagnosen.

TESTVERFAHREN

Jede Patientenprobe immer im Doppelansatz testen.

Die mitgelieferten, gebrauchsfertigen Positiv- und Negativkontrollen stets im Doppelansatz bei jedem Testlauf mitführen.

Alle verwendeten Reagenzien sollten Raumtemperatur (20-23 °C) erreicht haben.

Es wird empfohlen, einen Leerwert (Blank) nur mit Substratlösung vorzubereiten. Dazu ein leeres Well mitführen, das nur zum Schluss mit Substrat befüllt wird.

1. Waschlösung vorbereiten. (Siehe unter "Vorbereitung der Reagenzien").
2. Die Menge an Substratlösung vorbereiten, die für den Tagesgebrauch ausreicht. (Siehe unter "Vorbereitung der Reagenzien").
3. Die Patientenseren 1:500 (im Doppelansatz) mittels Teströhrchen in zwei Schritten verdünnen.
Schritt I: 10 µl Serum + 190 µl Probenverdünnungspuffer.
Schritt II: 15 µl Serum aus Schritt I + 360 µl Probenverdünnungspuffer.
4. Die benötigte Anzahl an Streifen in den Rahmen setzen.
5. Um die Aktivität des PERTUSSCAN PT IgG-Tests zu maximieren, den Test stets mit dem viermaligen Waschen aller Wells beginnen (siehe unter "Waschprozedur").
6. Je 100 µl der folgenden gebrauchsfertigen Kontrollen pipettieren:
PT IgG Positivkontrolle.
Negativkontrolle (grün etikettiert).
DIE KONTROLLEN NICHT VERDÜNNEN.
7. Je 100 µl der frisch vorverdünnten Patientenseren im Doppelansatz pipettieren.
8. 60 Minuten bei 37 °C inkubieren.
9. Alle Wells viermal waschen. (Siehe unter "Waschprozedur").
10. Je 100 µl Konjugat in die Wells pipettieren.
DAS KONJUGAT NICHT VERDÜNNEN.
11. 60 Minuten bei 37 °C inkubieren.
12. Alle Wells viermal waschen (siehe unter "Waschprozedur").
13. In alle Wells 100 µl Substrat pipettieren.
14. 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.
15. In alle Wells 100 µl Stopplösung pipettieren.
16. Die Extinktionswerte bei 405 nm messen.

Bitte beachten: Vor der Berechnung der Testergebnisse muss die Extinktion des Leerwerts von allen anderen Wells subtrahiert werden.

TESTVALIDIERUNG

Für jede Kontrolle aus dem Doppelansatz den Mittelwert berechnen.

	Sollwert OD (bei 405 nm)	Zulässiger Bereich
Positivkontrolle	1,00	0,77 – 1,43
Negativkontrolle	-	< 0,3

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Um Positivkontrollen zu korrigieren, die nicht den Sollwert von 1,0 erreichen, muss wie folgt gerechnet werden:

$$\frac{\text{OD}_{\text{Probe}}}{\text{OD}_{\text{Positivkontrolle}}}$$

Die korrigierte OD der Gleichung wird bei der Ergebnisinterpretation verwendet.

INTERPRETATION DES PERTUSSCAN PT IgG

(Siehe auch "Probenentnahme").

Bilden Sie für alle Patientenproben aus den Doppelwerten den Mittelwert.

Gepaarte Proben

Eine Verdopplung der Extinktion zwischen der ersten und der zweiten Probe stellt einen signifikanten Anstieg der Antikörper dar.

Ein signifikanter Anstieg in anti-PT-IgG weist auf eine aktuelle/frische Infektion hin.

Einzel- (Rekonvaleszenz-) Proben

Eine Probe, die 4-6 Wochen nach Einsetzen der Symptome bei einem nicht geimpften Kind und nach ≥ 10 Tagen bei einem geimpften Kind oder einem Erwachsenen entnommen wurde, und einen IgG-Titer zeigt von:

$\geq 1,5$, weist stark auf eine aktuelle/frische Infektion hin (Spezifität 99,1 %).
 $\geq 1,0$, weist auf eine aktuelle/frische Infektion hin (Spezifität 97,2 %).

NB

- Der Extinktionswert einer Probe kann von einem zum anderen Testlauf leicht abweichen. Das liegt hauptsächlich an leichten Unterschieden in den Testläufen hinsichtlich Pipettiertechnik, der Temperatur im Inkubator wie im Labor sowie dem Zeitfaktor bei Inkubationen.

- Einige Proben sind möglicherweise nicht wiederholt reaktiv. Häufige Ursachen sind:
 - a. Unsachgemäßes Waschen
 - b. Verwendung verfallener Reagenzien
 - c. Kreuzkontamination aus benachbarten positiven Plattenwells.
- Ein Titer $\geq 1,5$ ist für eine aktuelle/frische Pertussis nur dann aussagekräftig, wenn innerhalb der letzten 12 Monate vor der Blutentnahme keine Pertussis-Impfstoffe gegeben wurden.
- Eine Extinktion über 0,3 weist auf die Anwesenheit von Antikörpern hin.
- Ältere Personen (>60 Jahre) können auf eine aktuelle/frische Infektion keine erhöhte PT IgG-Anwort haben, dies kann dann aber über eine erhöhte FHA IgA ($\geq 0,6$) Antwort (Pertusscan TRO) diagnostiziert werden.
- Wenn eine weitere Bestätigung eines erhöhten IgG-Extinktionswerts auf PT bei $\geq 1,0$ - $< 1,5$ indiziert ist, kann Pertusscan TRO verwendet werden:
 - eine aktuelle Pertussis-Infektion ist bestätigt, wenn ebenfalls IgA auf PT und/oder FHA erhöht ist.
- Der Cut-off-Grenzwert von 1,5 entspricht ≥ 110 EU/ml gegen den US-FDA-Standard Charge 3.
 - Der Cut-off-Wert von $\geq 1,0$ entspricht ≥ 70 EU/ml.
 - Der Cut-off-Wert von 0,3 entspricht 18 EU/ml.

Pertusscan PT IgG-Test wird gegen NIBSC kontrolliert.

EINSCHRÄNKUNGEN

Für eine klinische Therapie darf dieser Test alleine keine Entscheidungsgrundlage bilden, sondern muss immer in Ergänzung mit klinischen Symptomen und Ergebnissen anderer verfügbarer Tests gesehen werden.

TESTCHARAKTERISTIKA

Tabelle 1. **Klinische Sensitivität und Spezifität.** Es wurden retrospektiv insgesamt 159 eingefrorene Proben getestet. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst:

Kontroll- und Krankheitsgruppen	Gesamtmenge	Positiver Cut-off OD $\geq 1,5$	Positiver Cut-off OD $\geq 1,0$
PT IgG positive Proben	52	43	51
Routineproben (keine Atemwegserkrankungen)	107	1	3

Klinische Sensitivität: 52 Proben von Patienten mit der Diagnose einer Pertussis-Infektion wurden auf erhöhte PT IgG-Werte hin untersucht.

Cut-off OD $\geq 1,0$; Sensitivität 51/52 = 98,1 % 95% CI = 89,7 % - 100 %

Cut-off OD $\geq 1,5$; Sensitivität 43/52 = 82,7 % 95% CI = 69,7 % - 91,8 %

Klinische Spezifität: 107 Routineproben (keine Atemwegserkrankungen) wurden untersucht.

Cut-off OD $\geq 1,0$; Spezifität 104/107 = 97,2 % 95% CI = 92,0 % - 99,4 %

Cut-off OD $\geq 1,5$; Spezifität 106/107 = 99,1 % 95% CI = 94,9 % - 100 %

Der 95%-Vertrauensbereich (CI) wurde mit der exakten Methode errechnet.

Tabelle 2. **Präzision von Charge zu Charge** wurde durch Testen von zehn verschiedenen Proben in achtfachem Ansatz mit drei verschiedenen Chargen bestimmt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mittelwert OD	0,43	0,12	0,07	0,20	0,76	1	1,23	0,89	2,12	1,86
SA	0,02	0,01	0,01	0,01	0,07	0,03	0,12	0,06	0,04	0,13
% VK	3,8	8,6	9,2	6,9	8,7	2,6	9,9	6,6	2,1	6,9

Tabelle 3. **Inter-Assay-Präzision** wurde durch Testen von zehn verschiedenen Proben in achtfachem Ansatz in drei verschiedenen Testläufen bestimmt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mittelwert OD	0,42	0,11	0,06	0,19	0,71	0,97	1,28	0,83	2,18	1,72
SA	0,01	0	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,02
% VK	1,5	2,7	4,6	3,6	1,7	1,6	1,7	3,8	2,4	0,9

Tabelle 4. **Intra-Assay-Präzision** wurde durch Testen von zehn verschiedenen Proben in achtfachem Ansatz in einem Testlauf bestimmt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mittelwert OD	0,42	0,11	0,06	0,2	0,72	0,98	1,3	0,86	2,15	1,7
SA	0,03	0	0	0,01	0,04	0,05	0,07	0,03	0,1	0,1
% VK	6,1	4,0	5,3	4,9	4,8	5,8	4,8	3,9	3,5	5,8

Fehlersuche

Problem:	Mögliche Ursachen:	Lösung:
Kontroll-Werte außerhalb des Zielbereichs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Falsche(s) Temperatur, Zeit oder Pipettieren, Reagenz nicht gemischt. 2. Kreuzkontamination der Kontrollen. 3. Falsche Verdünnung. 4. Strahlengang der Messung ist gestört. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Überprüfen, ob Zeit und Temperatur korrekt waren. Siehe unten "Schlechte Präzision". Test wiederholen. 2. Sorgfältig pipettieren. 3. Test wiederholen. 4. Auf Verschmutzung oder Luftblasen in den Wells prüfen. Unterseite der Platte abwischen und erneut ablesen.
Alle Testergebnisse negativ.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ein Reagenz oder mehrere nicht hinzugefügt oder in der falschen Reihenfolge zugegeben. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Testablauf überprüfen. Auf nicht verwendetes Reagenz hin überprüfen. Test wiederholen.
Alle Testergebnisse gelb.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontaminierte Puffer oder Reagenzien. 2. Waschlösung kontaminiert. 3. Falsche Serumverdünnung. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Alle Lösungen auf Trübung prüfen. 2. Sauberen Behälter verwenden. Die Qualität des zur Vorbereitung verwendeten Wassers prüfen. 3. Test wiederholen.
Schlechte Präzision	<ol style="list-style-type: none"> 1. VK der Pipettierung größer als 5 %. 2. Serum oder Reagenzien nicht ausreichend gemischt oder nicht auf Raumtemperatur gebracht. 3. Hinzugeben des Reagenzes dauert zu lange, Zeitintervalle nicht einheitlich. 4. Strahlengang der Messung ist gestört. 5. Uneinheitliches Waschen, eingeschlossene Luftblasen, Waschlösung bleibt in den Wells zurück. 6. Unsauberes Pipettieren. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pipettenkalibrierung überprüfen. Mit reproduzierbarer Technik arbeiten. 2. Alle Reagenzien sanft aber gründlich mischen und auf Raumtemperatur bringen. 3. Für eine konsistente einheitliche Technik sorgen und Multipette oder Autodispenser verwenden, um Zeit zu sparen. 4. Kavitäten auf Luftblasen überprüfen. Unterseite der Platte abwischen und erneut ablesen. 5. Überprüfen, ob alle Wells gleichmäßig gefüllt und abgesaugt werden. Die Flüssigkeitsmenge so wählen, dass sie über dem Reagenzienspiegel im Well liegt. Nach dem letzten Waschen die Wells durch Klopfen des Streifens auf saugfähigen Zellstoff ausleeren. 6. Luftblasen in den Pipettenspitzen vermeiden.

LITERATUR

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons \leq 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt C-R, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1781–1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Erklärung der Symbole

	Chargennummer
	Katalog-Nummer
	Verfallsdatum
	Temperaturbereich
	Biologische Gefährdung
	Arbeitsanleitung vor Gebrauch lesen
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Hersteller
	Achtung
 96	Inhalt ausreichend für 96 Tests
	Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu <i>In-vitro</i> -Diagnostika.

Ag	Antigen PT (beschichtete Streifen)
DIL	Probenverdünnungspuffer
WASHBUF 40x	Waschpuffer, 40-fach konzentriert.
CONTROL -	PT IgG Negativ-Kontrolle
CONTROL + PT IgG	PT IgG Positiv-Kontrolle,
CONJ PT IgG	PT IgG Konjugat
SUBSBUF	Substratpuffer
SUBS TAB pNPP	Substrat-Tabletten, pNPP
SOLN STOP	Stopplösung (Natriumhydroxid, 0,4 M)

IgG PT PERTUSSCAN

ELISA per la rilevazione di IgG contro la tossina Bordetella Pertussis (PT)
in siero
(Cat. N. PERT- PTG2)

Strisce di microtitolazione (12 x 8) 96 pozzetti
Conservare il kit a +2-8° C
Solo per uso diagnostico in vitro

USO PREVISTO DEL TEST

L'IgG PT Pertusscan è un dosaggio immunoassorbente legato ad enzima (ELISA) per la rilevazione degli anticorpi IgG contro la tossina della pertosse (PT) Bordetella in campioni di siero. Scopo del test è determinare l'infezione corrente/recente.

L'analisi deve essere eseguita da professionisti di laboratorio esperti.

“Per uso diagnostico in vitro”.

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

La pertosse o tosse asinina è una patologia batterica contagiosa provocata dal batterio Bordetella Pertussis.

I sintomi iniziali sono lievi (simili a quelli di un comune raffreddore), ma si evolvono in gravi accessi di tosse, che generano il suono acuto disarmonico (da cui il nome) nei neonati e nei bambini che ne sono affetti quando inspirano aria dopo avere tossito. La fase della tosse dura circa sei settimane prima di affievolirsi. La prevenzione tramite vaccinazione è di primaria importanza in quanto il trattamento produce benefici clinici ridotti nella persona che ne è affetta. Gli antibiotici, tuttavia, riducono la durata dell'infezione e sono quindi raccomandati in molti paesi. La tossina della pertosse (PT) ha una rilevanza notevole nella patogenesi della tosse asinina. È una vera e propria esotossina responsabile di numerosi effetti fisiologici, immunologici e farmacologici. La tossina della pertosse è inoltre altamente specifica per la B. pertussis a differenza di altre esotossine della specie Bordetella. La sierologia con determinazione dell'IgG contro la PT si è dimostrata particolarmente utile per la diagnosi tardiva nei bambini più grandi e negli adulti.

PRINCIPIO DEL TEST

Il dosaggio consiste in strisce di microtitolazione rivestite con PT altamente purificata come antigene. Negli individui affetti, gli anticorpi prodotti contro la PT si legano all'antigene. Gli IgG anti-umani coniugati con fosfatasi alcalina si legano agli anticorpi umani fissati all'antigene. Quando si aggiunge il substrato, si sviluppa il colore giallo la cui intensità (letta in un fotometro) è proporzionale alla quantità degli anticorpi legati.

MATERIALI FORNITI

Un telaio con strisce di microtitolazione (12x8) con pozzetti, rivestite con antigene PT, avvolti in fogli di alluminio con una sostanza igroscopica.

Controlli

IgG PT di controllo positivo. Pronto all'uso

1 flacone contenente 1,5 ml, soluzione blu

IgG PT di controllo negativo (etichetta verde). Pronto all'uso

1 flacone contenente 4,0 ml, soluzione blu

Tampone per la diluizione dei campioni. Pronto all'uso

2 flaconi contenenti 25 ml, soluzione blu

Tampone di lavaggio

1 flacone contenente 35 ml, concentrato 40 x

Coniugato

Coniugato IgG antiumano. Pronto all'uso

2 flaconi contenenti 6,0 ml, soluzione arancione

Compresse di substrato

1 striscia contenente 6 x 1 compresse

Tampone di substrato

1 flacone contenente 30 ml

Soluzione di arresto

1 flacone contenente 30 ml

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Lettore per micropiastra con filtro 405 nm.
- Pipette di precisione con puntali monouso.
- Washer per strisce, tessuto assorbente, provette e timer.
- Blocchi di incubazione o incubatrice (37°C).
- Contenitore non metallico per la preparazione di soluzione di substrato.

REAGENTI

Tutti i reagenti dovranno essere utilizzati a temperatura ambiente.

Tampone per la diluizione dei campioni. Contiene tampone fosfato salino (PBS), 0,09% sodio azoturo. Pronto all'uso.

Tampone di lavaggio concentrato 40x. 29% cloruro di sodio, 2% Tween 20 e 0,09% sodio azoturo. Diluire prima dell'uso.

Controlli

Un siero umano positivo IgG PT e un siero umano negativo IgG PT. Tutti i sieri sono testati per la negatività ad HBsAg e agli anticorpi HIV e HCV. Entrambi i controlli sono pronti all'uso.

Il coniugato contiene IgG antiumani di capra coniugati con fosfatasi alcalina. Pronto all'uso.

Compresse di substrato. Fosfato P-Nitrofenile, 5 mg/compressa.

Attenzione! Evitare il contatto con il metallo.

Tampone di substrato. Contiene 1M Dietanolamina e 0,5 mM cloruro di magnesio. Pronto all'uso.

Soluzione di arresto. Contiene 0,4 M idrossido di sodio, EDTA, tampone carbonato (pH >10). Evitare il contatto del reagente con la pelle. Pronto all'uso.

SICUREZZA E PRECAUZIONI

Generale

I campioni di siero da testare possono contenere agenti infettivi e dovranno essere manipolati adeguatamente.

Non pipettare per bocca, non fumare, mangiare o bere nelle aree di manipolazione di campioni o reagenti del kit.

Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.

Piastra ELISA

Manipolare con cautela le strisce di microtitolazione. Per prevenire la contaminazione dei pozzetti non toccare la parte superiore delle strisce con le dita. Pipettare con cautela per evitare graffiature all'interno del pozzetto. Dopo avere pipettato, controllare la presenza di bolle d'aria nei pozzetti ed eventualmente eliminarle picchiando delicatamente il supporto della striscia.

Controllo positivo

Contiene siero umano positivo per IgG PT. Da considerarsi potenzialmente infetto. Manipolare con cautela. Testato per la negatività agli anticorpi HIV e HCV e ad HbSAg.

Controllo negativo

Contiene siero umano negativo per IgG PT. Da considerarsi potenzialmente infetto. Manipolare con cautela. Testato per la negatività agli anticorpi HIV e HCV e ad HbSAg.

Coniugato, tampone per la diluizione dei campioni

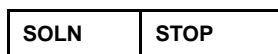
Contiene materiale biologico. Manipolare con cautela.

Soluzione di arresto

Contiene 0,4 M idrossido di sodio. Evitare il contatto con pelle, occhi e membrane mucose. Pulire eventuali fuoriuscite con abbondanti quantità di acqua. In caso di contatto con pelle od occhi, irrigare con acqua e consultare immediatamente un medico.



Attenzione



Contiene idrossido di sodio

- H315: Provoca irritazione cutanea.
 H319: Provoca grave irritazione ocular.
 P264: Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
 P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 P302+352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
 P305+351 +338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
 P332+313: In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
 P337+313: Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

Poiché nessun metodo di prova può garantire la completa assenza dei virus HIV, HCV, epatite B o di altri agenti infettivi, i campioni e i reagenti a base umana dovranno essere ritenuti in grado di trasmettere agenti infettivi.

I Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie e gli Istituti nazionali di sanità consigliano di manipolare i potenziali agenti infettivi a livello di biosicurezza 2.

Tampone di substrato

Contiene 9,7% Dietanolamina.



SUBSBUF

Attenzione

Contiene Dietanolamina

- H319: Provoca grave irritazione ocular.
- P264: Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
- P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
- P305+351
+338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
- P337+313: Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE

Generale

Conservare sempre il kit per test e il relativo contenuto a 2-8° C.

Il kit per test e il relativo contenuto dovranno essere utilizzati a temperatura ambiente.

NON UTILIZZARE KIT O COMPONENTI DOPO LA DATA DI SCADENZA.

NON MISCELARE REAGENTI CON NUMERI DI LOTTO DIVERSI.

Soluzione di substrato

La soluzione di substrato preparata deve essere utilizzata il giorno stesso.

Conservare al buio a temperatura ambiente (20-23° C).

Soluzione di lavaggio

Utilizzare la soluzione di lavaggio preparata entro 3 settimane. Conservare a temperatura ambiente (20-23° C).

Strisce di microtitolazione

Estrarre soltanto il numero di strisce necessario al test, risigillando con cura la confezione di alluminio. Conservare a 2-8° C.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Tutti i reagenti dovranno essere utilizzati a temperatura ambiente.

Soluzione di lavaggio

Diluire 1 bottiglia di tampone di lavaggio (35 ml) a 1400 ml con acqua distillata. La quantità preparata di soluzione tampone di lavaggio è sufficiente per 12 strisce di micro titolazione e stabile per 3 settimane a 20-23° C.

Soluzione di substrato

Preparare soltanto la quantità sufficiente per l'utilizzo di un giorno (100 µl/pozzetto).

1 compressa di substrato sciolta in 5 ml di soluzione di substrato.

Attenzione! La soluzione di substrato è stabile per 1 giorno. Conservare la soluzione preparata al buio e non superare la temperatura ambiente.

ISTRUZIONI PER IL LAVAGGIO

Iniziare sempre la procedura di prova lavando ogni pozzetto quattro volte.

Seguire rigorosamente le istruzioni di lavaggio in quanto il lavaggio incompleto può compromettere il risultato del test.

Il lavaggio può essere eseguito tramite washer automatico della piastra di microtitolazione oppure manualmente.

Lavaggio con attrezzatura di lavaggio automatico della piastra di microtitolazione

Quando si utilizza l'attrezzatura di lavaggio automatico della piastra, verificare che sia possibile aspirare completamente i pozzetti e che il tampone di lavaggio possa essere distribuito correttamente fino a raggiungere il bordo di ogni pozzetto durante il ciclo di lavaggio. Il washer dovrà essere programmato per l'esecuzione di 4 cicli di lavaggio. Proseguire immediatamente fino alla fase successiva di aggiunta del reagente.

Lavaggio manuale

1. Riempire i pozzetti con 0,3 ml di soluzione di lavaggio.
2. Lasciare riposare i pozzetti pieni per almeno 30 secondi.
3. Svuotare i pozzetti capovolgendo la piastra di microtitolazione e compiendo successivamente un movimento verticale breve e deciso.
4. Eseguire il ciclo di lavaggio (1, 2 e 3) 4 volte.
5. Riporre la piastra capovolta su asciugamani di carta assorbente e picchiettare sulla piastra con decisione per eliminare i residui della soluzione di lavaggio nei pozzetti.
6. Proseguire immediatamente fino alla fase successiva di aggiunta del reagente.

Non graffiare l'interno del pozzetto.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il dosaggio di IgG PT Pertusscan deve essere utilizzato con il siero. Manipolare come potenziale trasmettitore di agenti infettivi. Non utilizzare sieri itterici, lipemici o emolizzati. Non utilizzare i sieri resi inattivi dal calore in quanto possono provocare reazioni non specifiche.

Conservare il siero tra 2° e 8° C se si esegue il test entro cinque giorni. Se devono essere conservati per periodi più lunghi, mantenere i campioni a -20°C o a temperature inferiori. Non utilizzare un congelatore anti-sbrinamento in quanto i campioni potrebbero essere sottoposti a cicli di congelamento/scongelo con conseguente degrado degli anticorpi. I campioni non correttamente conservati o soggetti a più cicli di congelamento/scongelo possono provocare risultati spuri.

Il CLSI fornisce raccomandazioni per la conservazione dei campioni di sangue (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Coppie di campioni

Il metodo più affidabile per diagnosticare un'infezione di pertosse corrente/recente è l'aumento significativo del titolo (= un raddoppio del valore di assorbanza) di IgG tra il campione acuto e quello convalescente.

Un campione si definisce acuto in quanto prelevato entro:

2-3 settimane per bambini non vaccinati

<7 giorni per adulti e bambini vaccinati, dopo l'insorgenza dei sintomi.

Qualora il primo campione sia stato prelevato dopo gli intervalli indicati, è possibile che non si rilevi regolarmente un aumento significativo del titolo.

Campioni singoli (convalescenti)

L'infezione corrente/recente di pertosse è inoltre indicata da un IgG PT elevato (vedere il cut-off nell'interpretazione) nei campioni convalescenti, definito come campione prelevato dopo l'insorgenza dei sintomi

- ≥3 settimane per bambini non vaccinati
- ≥10 giorni per adulti e bambini vaccinati

NB

La vaccinazione entro 1 anno prima del campionamento rende incerta la diagnosi sierologica.

PROCEDURA DI PROVA

Testare sempre ogni campione del paziente in duplicati.

A ogni test eseguito, utilizzare sempre i controlli positivi e negativi pronti all'uso forniti in duplicati.

Tutti i reagenti dovranno essere utilizzati a temperatura ambiente (20-23° C).

Si consiglia di preparare un vuoto con soltanto la soluzione di substrato, utilizzando semplicemente un pozzetto vuoto a cui aggiungere la soluzione di substrato quando si aggiunge la stessa soluzione agli altri pozzetti.

1. Preparare la soluzione di lavaggio (vedere "Preparazione dei reagenti").
2. Preparare la quantità di soluzione di substrato sufficiente per l'utilizzo di un giorno (vedere "Preparazione dei reagenti").
3. Diluire i sieri dei pazienti 1:500 (in duplicato) nelle provette in due fasi.
Fase I: 10 µl siero + 190 µl tampone per la diluizione dei campioni.
Fase II: 15 µl siero dalla fase I + 360 µl tampone per la diluizione dei campioni.
4. Posizionare il numero adeguato di strisce nel telaio.
5. Per ottimizzare l'attività del dosaggio di IgG PT PERTUSSCAN, iniziare sempre le procedure lavando ogni pozzetto quattro volte (vedere "Istruzioni per il lavaggio").
6. Pipettare 100 µl di ogni controllo pronto all'uso come di seguito riportato.
IgG PT di controllo positivo.
Controllo negativo (etichetta verde).
NON DILUIRE I CONTROLLI.
7. Pipettare 100 µl di siero del paziente prediluito fresco in duplicato.
8. Incubare per 60 minuti a 37° C.
9. Lavare ogni pozzetto quattro volte (vedere "Istruzioni per il lavaggio").
10. Pipettare 100 µL di coniugato nei pozzetti.
NON DILUIRE IL CONIUGATO
11. Incubare per 60 minuti a 37° C.

12. Lavare ogni pozzetto quattro volte (vedere "Istruzioni per il lavaggio").
13. Pipettare 100 µl di soluzione di substrato in tutti i pozzetti di microtitolazione.
14. Incubare per 30 minuti a 37° C.
15. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in tutti i pozzetti di microtitolazione.
16. Leggere i valori di assorbanza a 405 nm.

Nota: prima di calcolare i risultati del test, sottrarre il valore DO del pozzetto vuoto da tutti gli altri pozzetti.

CONVALIDA DEL TEST

Calcolare la media dei pozzetti duplicati per ogni controllo.

	DO target (a 405 nm)	Range accettabile
Controlli positivi	1,00	0,77 – 1,43
Controllo negativo	-	<0,3

CALCOLO DEI RISULTATI

Per correggere un valore positivo che non soddisfi il valore target di 1,0, eseguire i calcoli necessari tenendo conto di:

$$\frac{DO_{\text{Campione}}}{DO_{\text{Controllo positivo}}}$$

La DO corretta nell'equazione viene utilizzata per interpretare il risultato.

INTERPRETAZIONE DI IgG PT PERTUSSCAN

(vedere anche "Raccolta dei campioni").

Calcolare la media dei campioni dei pazienti duplicati.

Coppie di campioni

Il raddoppio dell'assorbanza tra il primo e il secondo campione rappresenta un aumento significativo degli anticorpi.

Un aumento significativo degli IgG anti-PT indica un'infezione corrente/recente.

Campioni singoli (convalescenti)

Un campione, prelevato 4-6 settimane dopo l'insorgenza dei sintomi in un bambino non vaccinato e dopo ≥ 10 giorni dall'insorgenza dei sintomi in un adulto o bambino vaccinato, che mostri un titolo IgG:

$\geq 1,5$, indica decisamente un'infezione corrente/recente (specificità 99,1%)
 $\geq 1,0$, indica un'infezione corrente/recente (specificità 97,2%)

NB

- Il valore di assorbanza del campione di un test eseguito rispetto a un altro può variare leggermente. Ciò può essere dovuto a lievi differenze nella tecnica di pipettamento, nella temperatura in incubatrice e laboratorio e nel fattore tempo nelle incubazioni, durante l'esecuzione dei test.
- Alcuni campioni possono non risultare ripetutamente reattivi. Le cause comuni sono:
 - a. lavaggio non corretto,
 - b. utilizzo di reagenti scaduti,
 - c. contaminazione incrociata ("pick-up") da pozzetti di microtitolazione positivi vicini.
- Un titolo $\geq 1,5$ consente di diagnosticare la pertosse corrente/recente solo se non è stato somministrato alcun vaccino contro la pertosse entro 12 mesi prima del campionamento di sangue.
- Un valore di assorbanza superiore a 0,3 indica la presenza di anticorpi.
- Gli individui anziani (>60 anni) potrebbero non presentare un risposta IgG PT elevata a un'infezione corrente/recente, ma possono quindi ottenere la diagnosi da una risposta IgA FHA elevata ($\geq 0,6$) (Pertusscan TRO).
- L'ulteriore conferma di un valore di assorbanza elevato per IgG in PT a $\geq 1,0$ - $< 1,5$ consente di utilizzare Pertusscan TRO:
 - la pertosse corrente sarà confermata anche se risulta elevato l'IgA in PT e/o FHA
- Il limite di cut-off di 1,5 corrisponde a ≥ 110 EU/ml rispetto allo standard FDA USA.
Lotto 3
Il valore di cut-off di 1,0 corrisponde a ≥ 70 EU/ml
Il valore di cut-off di 0,3 corrisponde a ≥ 18 EU/ml

Il test IgG PT Pertusscan è controllato rispetto a NIBSC.

LIMITAZIONI

Il test non deve essere considerato l'unico fondamento per prendere decisioni sulla terapia clinica, ma usato come integrazione dei sintomi clinici e dei risultati di altri test disponibili.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Tabella 1. **Sensibilità e specificità clinica.** 159 sieri retrospettivi congelati in totale. I risultati sono riportati, in sintesi, nella tabella seguente:

Controllo e gruppi di malattie	Numero totale	Cut-off positivo OD $\geq 1,5$	Cut-off positivo OD $\geq 1,0$
Campioni positivi IgG PT	52	43	51
Campioni di routine (infezioni non respiratorie)	107	1	3

Sensibilità clinica: 52 campioni di pazienti con diagnosi di infezione da pertosse sono stati testati per livelli elevati di IgG PT.

DO cut-off $\geq 1,0$, sensibilità 51/52 = 98,1% 95% CI = 89,7% - 100%

DO cut-off $\geq 1,5$, sensibilità 43/52 = 82,7% 95% CI = 69,7% - 91,8%

Specificità clinica: sono stati testati 107 campioni di routine (infezioni non respiratorie).

OD cut-off $\geq 1,0$, specificità 104/107 = 97,2% 95% CI = 92,0% - 99,4%

DO cut-off $\geq 1,5$, specificità 106/107 = 99,1% 95% CI = 94,9% - 100%

L'intervallo di confidenza (CI) del 95% è stato calcolato con il metodo esatto.

Tabella 2. La variazione tra lotti è stata determinata da test su dieci diversi campioni in otto replicati in tre diversi lotti.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valore DO medio	0,43	0,12	0,07	0,20	0,76	1	1,23	0,89	2,12	1,86
SD	0,02	0,01	0,01	0,01	0,07	0,03	0,12	0,06	0,04	0,13
% CV	3,8	8,6	9,2	6,9	8,7	2,6	9,9	6,6	2,1	6,9

Tabella 3. La precisione interdosaggio è stata determinata da test su dieci diversi campioni in otto replicati in tre diversi casi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valore DO medio	0,42	0,11	0,06	0,19	0,71	0,97	1,28	0,83	2,18	1,72
SD	0,01	0	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,02
% CV	1,5	2,7	4,6	3,6	1,7	1,6	1,7	3,8	2,4	0,9

Tabella 4. La precisione intradosaggio è stata determinata da test su dieci diversi campioni in otto replicati in un solo caso.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valore DO medio	0,42	0,11	0,06	0,2	0,72	0,98	1,3	0,86	2,15	1,7
SD	0,03	0	0	0,01	0,04	0,05	0,07	0,03	0,1	0,1
% CV	6,1	4,0	5,3	4,9	4,8	5,8	4,8	3,9	3,5	5,8












Risoluzione dei problemi

Problema:	Possibili cause:	Soluzione:
Valori di controllo fuori limiti.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Temperatura, tempistica o pipettamento non corretto; reagenti non miscelati. 2. Contaminazione incrociata dei controlli. 3. Diluizione non corretta. 4. Percorso ottico non pulito. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Controllare che tempo e temperatura siano corretti. Vedere "Scarsa precisione" sotto. Ripetere il test. 2. Pipettare attentamente. 3. Ripetere il test. 4. Controllare la presenza di sporcizia o bolle d'aria nei pozzetti. Pulire il fondo e ripetere la lettura.
Risultati dei test negativi.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mancata aggiunta di uno o più reagenti oppure aggiunta nella sequenza errata. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ricontrollare la procedura. Controllare il reagente inutilizzato. Ripetere il test.
Risultati dei test gialli.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tamponi o reagenti contaminati. 2. Contaminazione della soluzione di lavaggio 3. Diluizione del siero non corretta. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Controllare la torbidità delle soluzioni. 2. Utilizzare un contenitore pulito. Controllare la qualità della soluzione in acqua utilizzata per la preparazione. 3. Ripetere il test.
Scarsa precisione.	<ol style="list-style-type: none"> 1. CV fornitura pipetta maggiore del 5%. 2. Siero o reagenti non sufficientemente miscelati o non bilanciati a temperatura ambiente. 3. Durata eccessiva dell'aggiunta di reagenti; intervalli di tempo non coerenti. 4. Percorso ottico non pulito. 5. Lavaggio non coerente; bolle intrappolate; soluzione di lavaggio residua nei pozzetti. 6. Pipettamento non corretto. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Controllare la taratura della pipetta. Utilizzare una tecnica riproducibile. 2. Miscelare i reagenti con cautela, ma accuratamente e bilanciare la temperatura ambiente. 3. Sviluppare una tecnica uniforme coerente e utilizzare un dispositivo a più puntali o un distributore automatico per ridurre il tempo. 4. Controllare la presenza di bolle d'aria nei pozzetti. Pulire il fondo e ripetere la lettura. 5. Controllare che i pozzetti vengano riempiti e aspirati in modo uniforme. Distribuire il liquido sopra il livello di reagenti nel pozzetto. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiando la striscia su un tessuto assorbente. 6. Evitare le bolle d'aria nei puntali delle pipette.

RIFERIMENTI

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons \leq 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt C-R, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1781–1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Spiegazione dei simboli.

	Codice lotto
	Numero di catalogo
	La data di scadenza.
	Limitazioni di temperatura
	Rishio biologico
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Produttore
	Attenzione
 96	Contenuto sufficiente per 96 test
	Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro

Ag	Antigene (strisce rivestite)
DIL	Tampone per la diluizione dei campioni
WASHBUF 40x	Tampone di lavaggio concentrato 40x
CONTROL -	Siero negativo IgG PT
CONTROL + PT IgG	Siero positivo IgG PT
CONJ PT IgG	Coniugato IgG PT
SUBSBUF	Tampone di substrato
SUBS TAB pNPP	Compresse di substrato
SOLN STOP	Soluzione di arresto (idrossido di sodio, 0,4 M)

PERTUSSCAN PT IgG

ELISA til påvisning af IgG mod Bordetella Pertussis toksin (PT)
i serum
(Kat.nr. PERT- PTG2)

Mikrotiterstrips (12x8) 96 brønde
Kittet skal opbevares ved +2-8°C
Kun til in vitro diagnostisk brug

TILSIGTET BRUG AF TESTEN

Pertusscan PT IgG er en enzymimmunoassay (ELISA) til bestemmelse af IgG antistoffer mod Bordetella pertussis toksin (PT) i serumprøver. Testen er beregnet til bestemmelse af aktuel/nylig infektion.

Analysen skal udføres af uddannet laboratoriepersonale.

"Til *in vitro* diagnostisk brug".

RESUMÉ OG FORKLARING

Pertussis, eller kighoste, er en smitsom bakteriesygdom, der forårsages af Bordetella pertussis bakterier.

Symptomerne er milde i starten (minder om en almindelig forkølelse), men vil udvikle sig til alvorlige hosteanfald, der producerer den karakteristiske høje 'kigende' lyd hos smittede spædbørn og børn, når de trækker vejret dybt ind efter at have hostet. Hosteperioden varer i ca. seks uger, før den aftager. Forebyggelse via vaccination er af primær vigtighed, da behandling kun er til svag klinisk gavn for den smittede person. Antibiotika kan imidlertid forkorte smitteperioden og anbefales derfor i mange lande. Pertussis toksinet (PT) er af signifikant betydning for patogenesen ved kighoste. Det er et ægte eksotoksin, der er ansvarligt for mange fysiologiske, immunologiske og farmakologiske virkninger. Herudover er Pertussis toksinet stærkt specifikt for B. Pertussis i modsætning til nogle andre eksotoksiner fra arten Bordetella. Serologi med bestemmelse af IgG mod PT har vist sig særlig nyttig for senere diagnose af ældre børn og voksne.

TESTENS PRINCIP

Analysen består af mikrotiterstrips belagt med højrenset PT som antigen. Hos smittede personer vil antistofferne, der produceres mod PT, binde sig til dets antigen. Alkalisk phosphatase-konjugeret anti-human IgG vil binde sig til de humane antistoffer, der er bundet til antigenet. Når substratet tilsættes, vil der udvikles en gul farve, hvis intensitet (aflæst i et fotometer) er proportionel med mængden af bundne antistoffer.

MATERIALER, DER MEDFØLGER

Et stativ med mikrotiterstrips (12x8) brønde belagt med PT antigen, pakket i foliepakke med tørremiddel

Kontroller

PT IgG positiv kontrol. Klar til brug

1 hætteglas, der indeholder 1,5 ml blå opløsning

PT IgG negativ kontrol (Grøn afmærkning). Klar til brug

1 hætteglas, der indeholder 4,0 ml blå opløsning

Prøve-fortyndingsbuffer. Klar til brug

2 hætteglas, der indeholder 25 ml blå opløsning

Vaskebuffer

1 hætteglas, der indeholder 35 ml, 40 x koncentreret

Konjugat

Anti-human IgG konjugat. Klar til brug

2 hætteglas, der indeholder 6,0 ml orange opløsning

Substrattabletter

1 strip, der indeholder 6 x 1 tablet

Substratbuffer

1 hætteglas, der indeholder 30 ml

Stopopløsning

1 hætteglas, der indeholder 30 ml

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Mikropladelæser med 405 nm filter.
- Præcisionspipetter med engangspidser.
- Vasker til strips, absorberende servietter, rør og en timer.
- Inkubationsblokke eller inkubator (37°C).
- Ikke-metallisk beholder til klargøring af substratopløsning.

REAGENSER

Alle reagenser skal have nået stuetemperatur, når de anvendes.

Prøve-fortyndingsbuffer. Indeholder fosfatbufferet saltopløsning (PBS), 0,09% natriumazid. Klar til brug.

Vaskebuffer, 40 x koncentreret. 29% natriumchlorid, 2% Tween 20 og 0,09% natriumazid. Fortynd før brug.

Kontroller

En PT IgG positiv human serum og en PT IgG negativ human serum. Alle sera er testet HBsAg og HIV- og HCV-antistofnegative. Begge kontroller er parat til brug.

Konjugatet indeholder gede-anti-humant IgG konjugeret med alkalisk fosfatase. Klar til brug.

Substrattabletter. P-Nitrophenyl phosphate, 5 mg/tablet. **Bemærk! Kontakt med metal skal undgås.**

Substratbuffer. Indeholder 1M diethanolamin og 0,5 mM magnesiumchlorid. Klar til brug.

Stopopløsning. Indeholder 0,4 M natriumhydroxid, EDTA, carbonatbuffer (pH >10). Reagensen må ikke komme i kontakt med hud. Klar til brug.

SIKKERHED OG FORHOLDSREGLER

Generelt

Serumprøver, der skal testes, kan indeholde infektiøse agenser og skal håndteres i overensstemmelse hermed.

Der må ikke pipetteres med munden, ryges eller indtages mad- eller drikkevarer på områder, hvor prøver og kittets reagenser håndteres.

Materiale-sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter i dette kit fås ved henvendelse til Euro Diagnostica.

ELISA-plade

Mikrotiterstrips skal håndteres med forsigtighed. For at undgå kontaminering af brønde, må man aldrig berøre den stripsenes øverste del med fingrene. Afpipetter forsigtigt for at undgå at ridse indersiden af brønden. Tjek for luftbobler i brøndene efter pipettering er udført. Hvis der er luftbobler tilstede, skal de fjernes ved at tappe forsigtigt på stripholderen.

Positiv kontrol

Indeholder human serum positiv for PT IgG. Skal betragtes som potentielt infektiøs. Skal håndteres med forsigtighed. Testet negativ for HIV- og HCV-antistof og HbSAg.

Negativ kontrol

Indeholder human serum negativ for PT IgG. Skal betragtes som potentielt infektiøs. Skal håndteres med forsigtighed. Testet negativ for HIV- og HCV-antistof og HbSAg.

Konjugat, prøvediluentbuffer

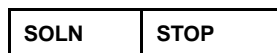
Indeholder biologisk materiale. Skal håndteres med forsigtighed.

Stopopløsning

Indeholder 0,4 M natriumhydroxid. Undgå kontakt med hud, øjne og slimhinder. Spild skal vaskes af med masser af vand og tørres op. Hvis kontakt med hud eller øjne forekommer, skal der omgående skylles med vand og søges lægehjælp.



Advarsel



Indeholder 0,4 M natriumhydroxid

H315:	Forårsaker hudirritasjon
H319:	Gir alvorlig øyeirritasjon.
P264:	Vask hænderne grundigt efter håndtering.
P280:	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.
P302+352:	VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand.
P305+351 +338:	VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
P332+313:	Ved hudirritation: Søg lægehjælp.
P337+313:	Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp.

Da der ikke er nogen testmetoder, der kan give fuldstændig forsikring for, at der ikke er HIV, HCV, hepatitis B virus eller andre infektiøse agenser til stede, skal prøver og human-baserede reagenser håndteres, som var de i stand til at overføre infektiøse agenser. Det amerikanske Center for Sygdomskontrol og Forebyggelse og det Nationale Sundhedsinstitut har anbefalet, at potentielt infektiøse agenser håndteres ved biosikkerhedsniveau 2.

Substratbuffer

Indeholder 9,7% diethanolamin.



Advarsel

SUBSBUF

Indeholder diethanolamin

- H319: Gir alvorlig øyeirritasjon.
 P264: Vask hænderne grundigt efter håndtering.
 P280: Bær beskytteshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/
 ansigtsbeskyttelse.
 P305+351 VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere
 +338: minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let.
 Fortsæt skylning.
 P337+313 Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp.

OPBEVARING

Generelt

Testkit og dets indhold skal altid opbevares ved 2-8°C.

Testkit og dets indhold skal have nået stuetemperatur før brug.

KITS OG KOMPONENTER MÅ IKKE ANVENDES EFTER UDLØBSDATOEN.
 MAN MÅ IKKE BLANDE REAGENSER MED FORSKELLIGE BATCHNUMRE.

Substratopløsning

Klargjort substratopløsning skal bruges på tilberedningsdagen.

Skal opbevares i mørke ved stuetemperatur (20-23°C).

Vaskeopløsning

Klargjort vaskeopløsning skal anvendes inden for 3 uger. Skal opbevares ved stuetemperaturforhold (20-23°C).

Mikrotiterstrips

Tag kun det antal strips, der skal anvendes til testning, ud og genforsegl aluminiumsfoliepakken omhyggeligt. Skal opbevares ved 2-8°C.

KLARGØRING AF REAGENSER

Alle reagenser skal have nået stuetemperatur, når de anvendes.

Vaskeopløsning

Fortynd 1 flaske vaskebuffer (35 ml) til 1400 ml med destilleret vand. Den klargjorte mængde vaskebufferopløsning er tilstrækkelig til 12 mikrotiterstrips og er stabil i 3 uger ved 20-23°C.

Substratopløsning

Klargør kun en mængde, der er tilstrækkelig til en dags brug (100 µl/brønd).
1 substrattablet opløst i 5 ml substratopløsning.

Bemærk! Substratopløsningen er stabil i 1 dag. Opbevar den klargjorte opløsning i mørke og ikke over stuetemperatur.

VASKEVEJLEDNING

Start altid testproceduren ved at vaske hver brønd fire gange.

Følg vaskevejledningen nøje, da ufuldstændig vaskning kan påvirke testresultatet.
Vask kan udføres enten med automatisk mikrotiterpladevasker eller manuelt.

Vask med automatisk vaskeudstyr for mikrotiterplade

Når der bruges et automatisk pladevaskeapparat, skal det kontrolleres, at alle brønde kan aspireres fuldstændigt og at vaskebufferen afgives korrekt, så den når kanten af hver brønd under hver eneste vaskecyklus. Vaskeapparatet skal programmeres til at udføre 4 vaskecyklusser.

Fortsæt umiddelbart til det næste reagenstilsætningstrin.

Manuel vaskning

1. Fyld alle brøndene med 0,3 ml vaskeopløsning.
2. Lad de fyldte brønde stå i mindst 30 sekunder.
3. Tøm brøndene ved at vende op og ned på mikrotiterpladen og derefter udføre en hurtig og kort lodret bevægelse.
4. Denne vaskecyklus (1, 2 og 3) skal udføres 4 gange.
5. Placér den omvendte plade på absorberende papirservietter og slå bestemt på pladen for at fjerne resterende vaskeopløsning i brøndene.
6. Fortsæt umiddelbart til det næste reagenstilsætningstrin.

Man må ikke skrabe på indersiden af brønden.

INDSAMLING AF PRØVER

Pertuscan PT IgG assay er beregnet til brug med serum. Skal håndteres, som var den i stand til at overføre infektiøse agenser. Undgå at bruge sera, der er ikterisk, lipæmisk eller hæmolysert.

Varmeinaktiveret sera kan give uspecifikke reaktiviteter og bør ikke anvendes.

Opbevar serum mellem 2-8°C, hvis testning vil finde sted indenfor fem dage. Hvis prøver skal opbevares i længere tid, skal de opbevares ved -20°C eller koldere. Brug ikke en frostfri fryser, da den kan lade prøverne gennemgå nedfrysnings-/optøningscyklusser, hvorved antistofferne nedbrydes. Prøver, der ikke opbevares korrekt eller gennemgår flere nedfrysnings-/optøningscyklusser, kan give falske resultater.

CLSI har opstillet anbefalinger for opbevaring af blodprøver (Godkendte standardprocedurer for håndtering og bearbejdning af blodprøver, H18A, 1990).

Parrede prøver

Den mest pålidelige metode til at diagnosticere en aktuel/nylig pertussis-infektion er ved at påvise en signifikant titerstigning (= en fordobling af absorbansværdien) i IgG mellem den akutte og rekonvalescent prøve.

En akut prøve defineres som at blive taget inden for:

2-3 uger for ikke-vaccinerede børn

<7 dage for vaccinerede børn og voksne efter frembrud af symptomer.

Hvis den første prøve er blevet taget senere end de indikerede intervaller, vil en signifikant stigning i titer ikke altid blive detekteret.

Enkelt- (rekonvalescent) prøver

Aktuel/nylig pertussis-infektion kan også påvises med forhøjet PT IgG (se cut-off under Fortolkning) i rekonvalescent-prøver, defineret som en prøve taget efter frembrud af symptomer

- ≥3 uger for ikke-vaccinerede børn
- ≥10 dage for vaccinerede børn og voksne

NB

Vaccination inden for 1 år inden prøvetagning gør den serologiske diagnose usikker.

TESTPROCEDURE

Patientprøver skal altid analyseres i duplikat.

Brug altid de medleverede positive og negative kontroller, der er klar til brug, i duplikater ved hver analysekørsel.

Alle reagenser skal anvendes ved stuetemperatur (20-23°C).

Vi anbefaler, at der klargøres en blank med kun substratopløsning. Det gøres helt enkelt ved at bruge en tom brønd, til hvilken der tilsættes substratopløsning, når der tilsættes substratopløsning til de andre brønde.

1. Klargør vaskeopløsning. (Se under "Klargøring af reagenser").
2. Klargør en mængde substratopløsning, der er tilstrækkelig til en dags brug. (Se under "Klargøring af reagenser").
3. Fortynd patientsera 1:500 (i duplikat) i prøverør i to trin.
Trin I: 10 µl serum + 190 µl prøve-fortyndingsbuffer.
Trin II: 15 µl serum fra trin I + 360 µl prøve-fortyndingsbuffer.
4. Placér det behørigt antal strips i stativet.
5. For at maksimere aktiviteten i PERTUSSCAN PT IgG assay, skal alle brønde vaskes fire gange inden analysen påbegyndes. (Se under "Vaskevejledning").
6. Afpipetter 100 µl af hver klar til brug-kontrol som følger.
PT IgG positiv kontrol.
Negativ kontrol (Grøn afmærkning).
KONTROLLERNE MÅ IKKE FORTYNDDES.
7. Afpipetter 100 µl af hver nyligt forfortyndet patientserum i duplikat.
8. Inkubér I 60 minutter ved 37°C.
9. Vask hver brønd fire gange. (Se under "Vaskevejledning").
10. Afpipetter 100 µl konjugat i brøndene.
KONJUGATET MÅ IKKE FORTYNDDES
11. Inkubér I 60 minutter ved 37°C.
12. Vask hver brønd fire gange. (Se under "Vaskevejledning").
13. Afpipetter 100 µl substratopløsning i alle mikrotiterbrønde.
14. Inkubér I 30 minutter ved 37°C.
15. Afpipetter 100 µl stopopløsning i alle mikrotiterbrønde.
16. Alæs absorbansværdier ved 405 nm.

Bemærk: Før beregning af testresultater skal OD-værdien af den blanke brønd subtraheres fra alle de øvrige brønde.

VALIDERING AF TEST

Beregn duplikatbrøndenes middelværdi for hver kontrol.

	Målværdi OD (ved 405 nm)	Acceptabelt område
Positive kontroller	1,00	0,77 – 1,43
Negativ kontrol	-	<0,3

BEREGNING AF RESULTATER

For at korrigere for positive kontroller, der ikke opfylder målværdien på 1,0, skal en beregning udføres i overensstemmelse med:

$$\frac{OD_{\text{Prøve}}}{OD_{\text{Positiv kontrol}}}$$

Den korrigerede OD fra ligningen anvendes til fortolkning af resultatet.

FORTOLKNING AF PERTUSSCAN PT IgG

(Se også "Indsamling af prøver").

Beregn middelværdien for alle duplikat-patientprøver.

Parrede prøver

En fordobling af absorbans mellem første og anden prøve repræsenterer en signifikant stigning i antistoffer.

En signifikant stigning i anti-PT-IgG indikerer aktuel/nylig infektion.

Enkelt- (reconvalescent) prøver

En prøve, der tages 4-6 uger efter frembrud af symptomer hos et ikke-vaccineret barn og efter ≥ 10 dage med symptomer hos et vaccineret barn eller en voksen, der viser en IgG titer:

$\geq 1,5$ indikerer stærkt en aktuel/nylig infektion (specificitet 99,1%)
 $\geq 1,0$ indikerer en aktuel/nylig infektion (specificitet 97,2%)

NB

- En prøves absorbansværdi kan variere lidt fra en analysekørsel til en anden. Dette skyldes hovedsageligt en svag variation i analysekørsler med hensyn til pipetteringsteknik, inkubator- og laboratorietemperatur og tidsfaktoren ved inkubationer.
- Nogle prøver vil måske ikke være gentageligt reaktive. Almindelige årsager hertil er:
 - a. forkert vaskning
 - b. brug af reagenser efter deres udløbsdato,
 - c. krydskontaminering ('pick ups') fra positive nabo-mikrotiterbrønde.
- En titer $\geq 1,5$ er kun diagnostisk for aktuel/nylig pertussis, hvis der ikke er blevet givet pertussis vaccine inden for 12 måneder inden blodprøven blev taget.
- En absorbansværdi over 0,3 indikerer tilstedeværelse af antistof
- Ældre personer (>60 år) kan have ingen forhøjet PT IgG respons på en aktuel/nylig infektion, men kan så blive diagnosticeret med en forhøjet FHA IgA ($\geq 0,6$) respons (Pertusscan TRO).
- Hvis yderligere bekræftelse på en forhøjet absorbansværdi på IgG mod PT på $\geq 1,0$ - $< 1,5$ er indikeret, kan Pertusscan TRO så anvendes:
 - aktuel pertussis vil blive bekræftet, hvis også IgA mod PT og/eller FHA er forhøjet
- Cut-off grænsen på 1,5 svarer til ≥ 110 EU/ml mod US FDA standard Lot 3
Cut-off værdien på $\geq 1,0$ svarer til ≥ 70 EU/ml
Cut-off værdien på 0,3 svarer til ≥ 18 EU/ml

Pertusscan PT IgG test kontrolles overfor NIBSC.

BEGRÆNSNINGER

Testen må ikke udgøre det eneste grundlag for beslutning om klinisk behandling, men skal bruges i kombination med kliniske symptomer og resultaterne af andre tilgængelige tests.

YDEEVNEKARAKTERISTIKA

Tabel 1. **Klinisk sensitivitet og specificitet.** I alt 159 frosne retrospektive sera. Den følgende tabel opsummerer resultaterne:

Kontrol og sygdomsgrupper	Samlet antal	Positiv cut off OD $\geq 1,5$	Positiv cut-off OD $\geq 1,0$
PT IgG positive prøver	52	43	51
Rutineprøver (ikke-respiratoriske infektioner)	107	1	3

Klinisk sensitivitet: 52 prøver fra patienter diagnosticeret med Pertussis infektion blev testet for forhøjede PT IgG niveauer.

Cut-off OD $\geq 1,0$, sensitivitet 51/52 = 98,1% 95% CI = 89,7% - 100%

Cut-off OD $\geq 1,5$, sensitivitet 43/52 = 82,7% 95% CI = 69,7% - 91,8%

Klinisk specificitet: 107 rutineprøver (ikke-respiratoriske infektioner) blev testet.

Cut-off OD $\geq 1,0$, specificitet 104/107 = 97,2% 95% CI = 92,0% - 99,4%

Cut-off OD $\geq 1,5$, specificitet 106/107 = 99,1% 95% CI = 94,9% - 100%

95% konfidensintervallet (CI) blev beregnet med den eksakte metode.

Tabel 2. Batch til batch-variation blev bestemt ved at teste ti forskellige prøver i otte replikater på tre forskellige batches.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Middel-OD-værdi	0,43	0,12	0,07	0,20	0,76	1	1,23	0,89	2,12	1,86
SD	0,02	0,01	0,01	0,01	0,07	0,03	0,12	0,06	0,04	0,13
% CV	3,8	8,6	9,2	6,9	8,7	2,6	9,9	6,6	2,1	6,9

Tabel 3. Inter-analyse præcision blev bestemt ved at teste ti forskellige prøver i otte replikater ved tre forskellige lejligheder.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Middel-OD-værdi	0,42	0,11	0,06	0,19	0,71	0,97	1,28	0,83	2,18	1,72
SD	0,01	0	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,02
% CV	1,5	2,7	4,6	3,6	1,7	1,6	1,7	3,8	2,4	0,9

Tabel 4. Inter-analyse præcision blev bestemt ved at teste ti forskellige prøver i otte replikater ved en lejlighed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Middel-OD-værdi	0,42	0,11	0,06	0,2	0,72	0,98	1,3	0,86	2,15	1,7
SD	0,03	0	0	0,01	0,04	0,05	0,07	0,03	0,1	0,1
% CV	6,1	4,0	5,3	4,9	4,8	5,8	4,8	3,9	3,5	5,8












Problemløsning

Problem:	Mulige årsager:	Løsning:
Kontrolværdier udenfor område.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Forkert temperatur, timing eller pipettering; reagenser ikke blandet. 2. Krydskontaminering af kontroller. 3. Ukorrekt fortynding. 4. Optisk sti ikke ren. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tjek at tid og temperatur var korrekt. Se "Ringe præcision" nedenfor. Gentag test. 2. Pipettér omhyggeligt. 3. Gentag test. 4. Tjek for snavs eller luftbobler i brøndene. Tør bunden af og aflæs igen.
Alle testresultater negative.	<ol style="list-style-type: none"> 1. En eller flere reagenser ikke tilføjet, eller tilføjet i den forkerte rækkefølge. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tjek proceduren igen. Tjek om der er ubrugte reagenser. Gentag test.
Alle testresultater gule.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontaminerede buffere eller reagenser. 2. Vaskeopløsning kontamineret. 3. Ukorrekt fortynding af serum. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tjek alle opløsninger for uklarhed. 2. Brug en ren beholder. Tjek kvaliteten af den vandopløsning, der bruges til fremstillingen. 3. Gentag test.
Ringe præcision.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pipetteleverings-reproducerbarhed (CV) større end 5%. 2. Serum eller reagenser ikke blandet tilstrækkeligt eller ikke nået op på stuetemperatur. 3. Reagenstilsætning tager for lang tid; Inkonsistens i timing-intervaller. 4. Optisk sti ikke ren. 5. Vaskning ikke konsistent; indfangne bobler; vaskeopløsning efterladt i brøndene. 6. Ukorrekt pipettering. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tjek pipettekalibrering. Anvend reproducerbar teknik. 2. Bland alle reagenser forsigtigt men grundigt og bring dem op på stuetemperatur. 3. Udvikl konsistent, ensartet teknik og brug multi-spids anordning eller auto-doseringsapparat for at reducere tiden. 4. Tjek for luftbobler i brøndene. Tør bunden af og aflæs igen. 5. Tjek at alle brøndene fyldes og opsuges ensartet. Tilsæt væske over reagensniveauet i brønden. Efter den sidste vask skal brøndene tømmes ved at tappe stripsen af på en absorberende serviet. 6. Undgå luftbobler i pipettespidser.

HENVISNINGER

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons ≤ 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt C-R, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1781–1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Symbolforklaring.

	Batchkode
	Bestillingsnummer
	Udløbsdato
	Opbevaringstemperatur.
	Biologiske risici
	Se brugsanvisning
	In vitro diagnostisk medicinsk anordning
	Producent
	Advarsel
 96	Indeholder tilstrækkelig for 96 test
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF

Ag	Antigen (belagte strips)
DIL	Prøvefortyndingsbuffer
WASHBUF 40x	Vaskebuffer, 40 x koncentreret.
CONTROL -	PT IgG negativ serum
CONTROL + PT IgG	PT IgG positiv serum
CONJ PT IgG	PT IgG konjugat
SUBSBUF	Substratbuffer
SUBS TAB pNPP	Substrattabletter
SOLN STOP	Stopopløsning (natriumhydroxid, 0,4 M)

PERTUSSCAN PT IgG

ELISA for påvisning av IgG mot Bordetella Pertussis-toksin (PT)
i serum
(Kat. nr. PERT-PTG2)

Mikrotitreringsremser (12x8) 96 brønner
Settet oppbevares ved +2-8 °C
Kun for bruk ved in vitro diagnostiske formål

BRUKSOMRÅDE FOR TESTEN

Pertusscan PT IgG er en ELISA-metode (enzyme linked immunosorbent assay) for påvisning av IgG-antistoffer mot Bordetella pertussis-toksin (PT) i serumprøver. Testen er indisert for å påvise akutt/nylig infeksjon.

Analysen bør utføres av opplært laboratoriepersonell.

"For bruk ved in vitro diagnostiske formål".

SAMMENDRAG OG FORKLARING

Pertussis, eller kikhoste, er en smittsom bakteriesykdom forårsaket av bakteriet Bordetella pertussis.

Symptomene er initialt milde (minner om vanlig forkjølelse), men vil utvikle seg til kraftige hosteanfall, som gir den karakteristiske høye "kikingen" hos infiserte spedbarn og barn når de trekker inn luft etter hoste. Hostestadiet varer i rundt seks uker før det avtar. Forebygging via vaksinasjon er det viktigste siden behandling er av liten klinisk nytte for den smittede personen. Antibiotika vil imidlertid redusere varigheten på smittsomheten og anbefales derfor i mange land. Pertussis-toksinet (PT) er av signifikant betydning for patogenesen for kikhoste. Det er en reell eksotoksisk årsak til mange fysiologiske, immunologiske og farmakologiske virkninger. I tillegg er pertussis-toksinet svært spesifikt for B. pertussis i motsetning til visse andre eksotoksiner av Bordetella-typen. Serologi med påvisning av IgG mot PT har vist seg svært effektiv ved senere diagnose hos eldre barn og voksne.

PRINSIPPET FOR TESTEN

Assayet består av mikrotiterremser dekket med høyrenset PT som antigen. Hos smittede personer vil antistoffer mot PT binde seg til sitt antigen. Alkalisk fosfatasekonjugert anti-humant IgG vil binde seg til humane antistoffer tilknyttet antigenet. Når substratet tilsettes, vil det utvikles en gul farge. Intensiteten på fargen (avlest i et fotometer) er proporsjonal med mengden bundne antistoffer.

MATERIALER SOM FØLGER MED

En ramme med mikrotiterremser (12x8), brønner dekket med PT-antigen, pakket i foliepose tørkemiddel

Kontrolløsninger

PT IgG-positiv kontrolløsning. Klar til bruk

1 hetteglass som inneholder 1,5 ml, blå løsning

PT IgG-negativ kontrolløsning (merket grønn). Klar til bruk

1 hetteglass som inneholder 4,0 ml, blå løsning

Prøvefortynningsbuffer. Klar til bruk

2 hetteglass som inneholder 25 ml, blå løsning

Vaskebuffer

1 hetteglass som inneholder 35 ml, 40 x konsentret

Konjugat

Anti-humant IgG-konjugat. Klar til bruk

2 hetteglass som inneholder 6,0 ml, oransje løsning

Substrattabletter

1 remse med 6 x 1 tabletter

Substratbuffer

1 hetteglass som inneholder 30 ml

Stoppløsning

1 hetteglass som inneholder 30 ml

NØDVENDIGE MATERIALER SOM IKKE FØLGER MED

- Mikroplateleser med filter, 405 nm.
- Presisjonspipetter med engangstupper.
- Vasker for remser, absorberende stoff, rør og en tidsmåler.
- Inkubasjonsblokker eller inkubator (37 °C).
- Ikke-metallisk beholder for klargjøring av substratløsning.

REAGENSER

Alle reagenser må ha oppnådd romtemperatur før bruk.

Prøvefortynningsbuffer. Inneholder fosfatbufret saltløsning (PBS), 0,09 % natriumazid. Klar til bruk.

Vaskebuffer, 40 x konsentrert. 29% natriumklorid, 2% Tween 20 og 0,09 % natriumazid. Fortynnes før bruk.

Kontrolløsninger

Ett PT IgG-positivt humant serum, og ett PT IgA-negativt humant serum. Alle sera er testet HBsAg- og HIV- og HCV-antistoffnegative. Begge kontrolløsninger er klare til bruk.

Konjugatet inneholder geite-antihumant IgG-konjugat med alkalisk fosfatase. Klar til bruk.

Substrattabletter. P-nitrofenylfosfat, 5 mg/tablett.

Merk: Kontakt med metall bør unngås.

Substratbuffer. Inneholder 1 M dietanolamin og 0,5 mM magnesiumklorid. Klar til bruk.

Stoppløsning. Inneholder 0,4 M natriumhydroksid, EDTA, karbonatbuffer (pH >10). Reagensen må ikke komme i kontakt med huden. Klar til bruk.

SIKKERHET OG FORHOLDSREGLER

Generelt

Serumprøver som skal testes kan inneholde smittsomme stoffer og må håndteres deretter.

Unngå pipettering med munnen, røyking, spising eller drikking i områder hvor prøver eller settreagenser blir behandlet.

På forespørsel Euro Diagnostica gi HMS-datablad på alle farlige komponenter som inngår i settet.

ELISA-plate

Mikrotiterremsene må håndteres med forsiktighet. For å unngå forurensing av brønnene, må de aldri berøres øverst. Pipetter forsiktig for å unngå å ripe opp innsiden av brønnen. Kontroller om det er bobler i brønnene etter pipetteringen. I så fall må de fjernes forsiktig ved å banke på remseholderen.

Positiv kontroll

Inneholder humant serum positivt for PT IgG. Må anses som smittefarlig. Håndteres med forsiktighet. Testet negative for HIV- og HCV-antistoff og HBsAg.

Negativ kontrolløsning

Inneholder humant serum negativt for PT IgG. Må anses som smittefarlig. Håndteres med forsiktighet. Testet negative for HIV- og HCV-antistoff og HBsAg.

Konjugat, prøvefortrynningsbuffer

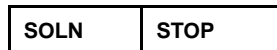
Inneholder biologisk materiale. Håndteres med forsiktighet.

Stoppløsning

Inneholder 0,4 M natriumhydroksid. Unngå kontakt med hud, øyne og slimhinner. Spill må tørkes opp med store mengder vann. Ved kontakt med hud eller øyne, skyll med vann og oppsøk lege øyeblikkelig.



Advarsel



Inneholder Natriumhydroksid

- H315: Forårsaker hudirritasjon
- H319: Gir alvorlig øyeirritasjon.
- P264: Vask hendene grundig etter behandling.
- P280: Bruk vernehansker/ verneklær / vernebriller / ansiktsskjerm .
- P302+352: VED HUDKONTAKT: Vask grundig med såpe og vann.
- P305+351 +338: VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen
- P332+313: Hvis hudirritasjon forekommer: Søk lægehjelp.
- P337+313: Hvis øyeirritasjon vedvarer: Søk legehjelp

Fordi ingen testmetoder kan gi fullstendig garanti om at HIV, HCV, hepatitt B-virus eller andre smittestoffer er fraværende, bør prøver og menneskebaserte reagenser håndteres som om de kan overføre smittestoffer.

Sentra for sykdomskontroll og forebygging og helsemyndighetene anbefaler at smittestoffer håndteres på sikkerhetsnivå (biosafety level) 2.

Substratbuffer

Inneholder 9,7% dietanolamin.



Advarsel

SUBSBUF

Inneholder: Dietanolamin

- H319: Gir alvorlig øyeirritasjon.
P264: Vask hendene grundig etter behandling.
P280: Bruk vernehansker/ verneklær / vernebriller / ansiktsskjerm.
P305+351 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.
+338:
P337+313: Hvis øyeirritasjon vedvarer: Søk legehjelp.

OPPBEVARING

Generelt

Testsett med innhold må alltid oppbevares ved 2-8 °C.
Testsettet med innhold bør være romtemperert før bruk.

SETT ELLER KOMPONENTER MÅ IKKE BRUKES ETTER UTLØPSDATOEN.
REAGENSER AV FORSKJELLIGE BATCHNUMRE MÅ IKKE Blandes.

Substratløsning

Klargjort substratløsning bør brukes samme dag.
Oppbevares mørkt ved romtemperatur (20-23 °C).

Vaskeløsning

Bruk klargjort vaskeløsning i løpet av 3 uker. Oppbevares i romtemperatur (20-30 °C).

Mikrotiterremser

Ta bare ut det antall remser som er nødvendig for testing. Forsegle aluminiumsfolieposen nøye igjen. Oppbevares ved 2-8 °C.

KLARGJØRING AV REAGENSER

Alle reagenser må ha oppnådd romtemperatur før bruk.

Vaskeløsning

Fortynn 1 flaske vaskebuffer (35 ml) med 1400 ml destillert vann. Den klargjorte mengden vaskebufferløsning er tilstrekkelig for 12 mikrotiterremser og er stabil i 3 uker ved 20-23 °C.

Substratløsning

Klargjør bare mengden som skal brukes samme dag (100 µl/brønn).
1 substrattablett oppløst i 5 ml substratløsning.

Merk: Substratløsningen er stabil i 1 dag. Oppbevar den klargjorte løsningen mørkt og ikke over romtemperatur.

VASKEANVISNINGER

Start alltid testprosedyren med å vaske hver brønn fire ganger.

Følg vaskeanvisningene nøye. Ufullstendig vasking kan innvirke på testresultatet. Vasking kan utføres enten med automatisk mikrotiterplatevasker eller manuelt.

Vasking med automatisk vaskeutstyr for mikrotiterplate

Ved bruk av det automatiserte platevaskeutstyret, kontroller at alle brønner kan aspireres fullstendig og at vaskebufferen blir korrekt dosert og når til kanten av hver brønn under hver vaskesyklus. Vaskeren må programmeres til å utføre fire skyllesykluser. Fortsett straks til det neste reagenstilsettingstrinnet.

Manuell vasking

1. Fyll alle brønnene med 0,3 ml vaskeløsning.
2. La de fylte brønnene stå i minst 30 sekunder.
3. Tøm brønnene ved å snu mikrotiterplaten opp-ned etter en bestemt, kort loddrett bevegelse.
4. Denne vaskesyklusen (1, 2 og 3) må utføres fire ganger.
5. Plasser platen opp-ned på absorberende papirhåndkle, og bank bestemt på platen for å fjerne rester av vaskeløsning i brønnene.
6. Fortsett straks til det neste reagenstilsettingstrinnet.

Ikke skrap opp innsiden av brønnen.

INNSAMLING AV PRØVER

Pertusscan PT IgG-assayet skal brukes med serum. Håndteres som om de kan overføre smittestoffer. Unngå bruk av sera som er ikteriske, lipemiske eller hemolyserte.

Varmedeaktiverte sera kan gi uspesifisert reaktivitet og bør ikke brukes.

Oppbevar serum mellom 2-8 °C hvis testing skal finne sted i løpet av fem dager. Hvis prøver skal oppbevares over lang tid, bør de oppbevares ved -20 °C eller kaldere. Frostfri fryser må ikke brukes fordi den kan la prøvene gå gjennom frysetiningssykluser og forringe antistoffene. Prøver som er ukorrekt oppbevart eller utsettes for flere frysetiningssykluser, kan gi falske resultater.

CLSI gir anbefalinger for oppbevaring av blodprøver, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Parede prøver

Den mest pålitelige metoden for å diagnostisere en akutt/nylig pertussis-infeksjon er ved å påvise en signifikant titerøkning (= en dobling av absorbanverdien) i IgG mellom den akutte prøven og rekonvalesentprøven.

En akutt prøve defineres som prøve tatt i løpet av:

2-3 uker for uvaksinerte barn

<7 dager for vaksinerte barn, og voksne, etter at symptomene startet.

Hvis den første prøven er tatt senere enn oppgitte intervaller, er det usikkert om en signifikant økning i titer blir registrert regelmessig.

Enkeltprøver (rekonvalesent)

Akutt/nylig pertussis-infeksjon vises også ved forhøyet PT IgG (se grenseverdiene under Tolkning) i rekonvalesentprøver, definert som en prøve tatt etter at symptomene startet

- ≥3 uker for uvaksinerte barn
- ≥10 dager for vaksinerte barn og voksne

Merk: Vaksinasjon innen ett år før prøvetaking innebærer at den serologiske diagnosen er usikker.

TESTPROSEDYRE

Test alltid hver pasientprøve flere ganger.

Bruk alltid medfølgende bruksklare positive og negative kontrolløsninger i duplikater ved hver testkjøring.

Alle reagenser bør brukes ved romtemperatur (20-23 °C).

Vi anbefaler å klargjøre en blindreagens kun med substratløsning. Dette gjøres ved å bruke en tom brønn som tilføres substratløsning når substratløsning tilføres de andre brønnene.

1. Klargjør vaskeløsningen. (Se under "Klargjøring av reagenser").
2. Klargjør mengden substratløsning som rekker til én dags bruk. (Se under "Klargjøring av reagenser").
3. Fortynn pasientsera 1:500 (i duplikat) i testrørene i to trinn.
Trinn I: 10 µl serum + 190 µl prøvefortynningsbuffer.
Trinn II: 15 µl serum fra trinn I + 360 µl prøvefortynningsbuffer.
4. Plasser aktuelt antall remser i ramme.
5. For å oppnå maks. aktivitet for PERTUSSCAN PT IgG-assayet, start alltid prosedyrene ved å vaske hver brønn fire ganger. (Se under "Vaskeanvisninger").
6. Pipetter 100 µl av hver bruksklare kontrolløsning som følger.
PT IgG-positiv kontrolløsning.
Negativ kontrolløsning (merket grønn).
 a. KONTROLLØSNINGENE MÅ IKKE FORTYNNES.
7. Pipetter 100 µl av hver fortyntet pasientserumprøve i duplikat.
8. Inkuberes i 60 minutter ved 37 °C.
9. Vask hver brønn fire ganger. (Se under "Vaskeanvisninger").
10. Pipetter 100 µl konjugat i brønnene.
KONJUGATET MÅ IKKE FORTYNNES
11. Inkuberes i 60 minutter ved 37 °C.
12. Vask hver brønn fire ganger. (Se under "Vaskeanvisninger").
13. Pipetter 100 µl substratløsning i alle mikrotiterbrønner.
14. Inkuberes i 30 minutter ved 37 °C.
15. Pipetter 100 µl stoppløsning i alle mikrotiterbrønner.
16. Les av absorbansverdier ved 405 nm.

MERK: Før beregning av testresultatene må OD-verdien for blindbrønnen trekkes fra alle andre brønner.

VALIDERING AV TESTEN

Beregn middelværdien for duplikatbrønner for hver kontrolløsning.

	Mål-OD (ved 405 nm)	Akseptabelt område
Positive kontrolløsninger	1.00	0.77 – 1.43
Negativ kontrolløsning	-	<0.3

BEREGNING AV RESULTATENE

For å korrigere for positiv kontrolløsning som ikke oppnår målverdien på 1,0, må det foretas en beregning i henhold til:

$$\frac{\text{OD}_{\text{prøve}}}{\text{OD}_{\text{positiv kontrolløsning}}}$$

Korrigert OD fra ligningen brukes i tolkningen av resultatet.

TOLKNING AV PERTUSSCAN PT IgG

(Se også "Innsamling av prøver").

Beregn middelveidien for alle duplikatpasientprøver.

Parede prøver

En dobling av absorbans mellom første og andre prøve indikerer en signifikant økning av antistoffer.

En signifikant økning i anti-PT-IgG indikerer akutt/nylig infeksjon.

Enkeltprøver (rekonvalesent)

En prøve tatt 4-6 uker etter at symptomene startet hos et uvaksinert barn og etter ≥ 10 dager etter symptomer hos et vaksinert barn eller en voksen som viser en IgG-titer:

$\geq 1,5$ sterk indikasjon på akutt/nylig infeksjon (spesifisitet 99,1 %)
 $\geq 1,0$ indikerer en akutt/nylig infeksjon (spesifisitet 97,2 %)

Merk:

- Absorbansverdien for en prøve fra én testkjøring til en annen kan avvike noe. Dette skyldes hovedsaklig små forskjeller i testkjøringer når det gjelder pipetteringsteknikk, temperaturen i inkubatoren og laboratoriet, samt tidsfaktoren ved inkubasjoner.
- Noen prøver er ikke nødvendigvis reaktive ved gjentatte tester. Vanlige årsaker:
 - a. Ukorrekt vasking
 - b. Bruk av reagenser som er gått ut på dato,
 - c. Kryssforurensing ("pick ups") fra tilstøtende positive mikrotiterbrønner.
- En titer $\geq 1,5$ er kun diagnostisk for akutt/nylig pertussis hvis det ikke er gitt pertussis-vaksine innen 12 måneder før blodprøvetaking.
- En absorbansverdi over 0,3 indikerer tilstedeværelse av antistoffer.
- Eldre personer (>60 år) kan ha ikke-forhøyet PT IgG som respons på en akutt/nylig infeksjon, men deretter bli diagnostisert ved en forhøyet FHA IgA-respons ($\geq 0,6$) (Pertusscan TRO).
- Hvis ytterligere bekreftelse på en forhøyet absorbansverdi på IgG mot PT ved $\geq 1,0$ - $<1,5$ er indikert, kan Pertusscan TRO anvendes:
 - akutt pertussis bekreftes hvis også IgA mot PT og/eller FHA er forhøyet
- Grenseverdien 1,5 tilsvarer ≥ 110 EU/ml mot FDA-standard (USA) Lot 3
Grenseverdien på $\geq 1,0$ tilsvarer ≥ 70 EU/ml
Grenseverdien på 0,3 tilsvarer ≥ 18 EU/ml

Pertusscan PT IgG-test kontrolleres mot NIBSC.

BEGRENSNINGER

Testen bør ikke brukes som det eneste grunnlaget for beslutninger om klinisk behandling, men bør brukes som et supplement til kliniske symptomer og resultater fra andre tilgjengelige tester.

FUNKSJONSDATA

Tabell 1. **Klinisk sensitivitet og spesifisitet.** I alt 159 fryste retrospektive sera. Tabellen nedenfor oppsummerer resultatene.

Kontroll- og sykdomsgrupper	Totalt antall	Positiv grenseverdi OD \geq 1,5	Positiv grenseverdi OD \geq 1,0
PT IgG-positive prøver	52	43	51
Rutineprøver (ikke-respiratoriske infeksjoner)	107	1	3

Klinisk sensitivitet: 52 prøver fra pasienter diagnostisert med pertussis-infeksjon ble testet for forhøyede PT IgG-nivåer.

Grenseverdi OD \geq 1,0, sensitivitet 51/52 = 98,1% 95 % KI = 89,7 % - 100 %

Grenseverdi OD \geq 1,5, sensitivitet 43/52 = 82,7 % 95 % KI = 69,7 % - 91,8 %

Klinisk spesifisitet: 107 rutineprøver (ikke-respiratoriske infeksjoner) ble testet.

Grenseverdi OD \geq 1,0, spesifisitet 104/107 = 97,2 % 95 % KI = 92,0 % - 99,4 %

Grenseverdi OD \geq 1,5, spesifisitet 106/107 = 99,1 % 95 % KI = 94,9 % - 100 %

95 %-konfidensintervallet (KI) ble beregnet med nøyaktig metodikk.

Tabell 2. **Batch to batch-variasjonen** ble bestemt ved å teste ti forskjellige prøver i åtte replikater på tre forskjellige batcher.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gj.sn. OD-verdi	0.43	0.12	0.07	0.20	0.76	1	1.23	0.89	2.12	1.86
SD	0,02	0.01	0.01	0.01	0.07	0.03	0.12	0.06	0,04	0.13
% CV	3.8	8.6	9.2	6.9	8.7	2.6	9.9	6.6	2.1	6.9

Tabell 3. **Inter-assay presisjon** ble bestemt ved å teste ti forskjellige prøver i åtte replikater ved tre separate anledninger.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gj.sn. OD-verdi	0.42	0.11	0.06	0.19	0.71	0.97	1.28	0.83	2.18	1.72
SD	0.01	0	0	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05	0.02
% CV	1.5	2.7	4.6	3.6	1.7	1.6	1.7	3.8	2.4	0.9

Tabell 4. **Inter-assay presisjon** ble bestemt ved å teste ti forskjellige prøver i åtte replikater ved én anledning.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gj.sn. OD-verdi	0.42	0.11	0.06	0.2	0.72	0.98	1.3	0.86	2.15	1.7
SD	0.03	0	0	0.01	0.04	0.05	0.07	0.03	0.1	0.1
% CV	6.1	4.0	5.3	4.9	4.8	5.8	4.8	3.9	3.5	5.8

Feilsøking

Problem:	Mulige årsaker:	Løsning:
Kontrollverdier utenfor området.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ukorrekt temperatur, tidsbruk eller pipettering; reagenser ikke blandet. 2. Krysskontaminering av kontrollene. 3. Ukorrekt fortynning. 4. Optisk bane ikke ren. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontroller at tidsbruken og temperaturen var korrekt. Se "Dårlig presisjon" nedenfor. Gjenta testen. 2. Pipetter nøye. 3. Gjenta testen. 4. Sjekk om det er smuss eller luft i brønnene. Tørk av bunnen og les av på nytt.
Alle testresultater negative.	<ol style="list-style-type: none"> 1. En eller flere reagenser ikke tilført, eller tilført i ukorrekt rekkefølge. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sjekk prosedyren på nytt. Sjekk om det er ubrukt reagens. Gjenta testen.
Alle testresultater gule.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontaminerte buffere eller reagenser. 2. Vaskeløsning kontaminert. 3. Ukorrekt fortynning av serum. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontroller at alle løsninger er klare. 2. Bruk ren beholder. Kontroller kvaliteten på vannløsningen som brukes til klargjøringen. 3. Gjenta testen.
Dårlig presisjon.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pipetteleverings-CV høyere enn 5 %. 2. Serum eller reagens ikke blandet tilstrekkelig eller ikke ekvilibret til romtemperatur. 3. Reagenstilsetting tar for lang tid; Inkonsekvens i tidsintervaller. 4. Optisk bane ikke ren. 5. Ujevn vasking, gjenværende bobler; vaskeløsning igjen i brønnene. 6. Ukorrekt pipettering. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sjekk kalibreringen av pipetten. Bruk reproducerbar teknikk. 2. Bland alle reagenser varsomt, men grundig og ekvilibrer til romtemperatur. 3. Følg konsekvent én teknikk og bruk multituppenhet eller auto-dispenser for å redusere tidsbruken. 4. Sjekk om det er luftbobler i brønnene. Tørk av bunnen og les av på nytt. 5. Kontroller at alle brønner fylles og aspireres enhetlig. Tilsett væske over reagensnivået i brønnen. Etter siste vasking tømmes brønnene ved å banke remsen mot absorberende stoff. 6. Unngå luftbobler i pipettetuppene.

REFERANSER

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons ≤ 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt C-R, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1781–1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Symbolforklaring.

	Batch-kode
	Katalognummer
	Utløpsdato
	Oppbevares ved
	Biologisk risiko
	Les bruksanvisningen
	In vitro medisinsk diagnoseutstyr
	Produsent
	Advarsel
 96	Inneholder tilstrekkelig for 96 test
	Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF.

Ag	Antigen (belagte remser)
DIL	Prøvefortynningsbuffer
WASHBUF 40x	Vaskebuffer, 40 x konsentrert
CONTROL -	PT IgG-negativt serum
CONTROL + PT IgG	PT IgG-positivt serum
CONJ PT IgG	PT IgG-konjugat
SUBSBUF	Substratbuffer
SUBS TAB pNPP	Substrattabletter
SOLN STOP	Stoppløsning (natriumhydroksid, 0,4 M)

PERTUSSCAN PT IgG

ELISA för detektion av IgG mot Bordetella pertussis toxin (PT)
i serum
(Kat. Nr PERT-PTG2)

Mikrotitrerings remsor (12x8) 96 brunnar
Förvara kitet vid +2-8 ° C
Endast för in vitro diagnostik.

AVSEDD ANVÄNDNING AV TESTET

Pertusscan PT IgG är en enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) för detektering av IgG-antikroppar mot Bordetella pertussis-toxin (PT) i serumprover. Testet är avsett för bestämning av pågående/ nyligen genomgången infektion. Analysen bör utföras av utbildad laboratoriepersonal. För in vitro diagnostik.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Pertussis, eller kikhosta, är en smittsam bakteriell sjukdom orsakad av bakterien Bordetella pertussis.

Symtomen är initialt milda (liknar dem hos en vanlig förkylning), men kommer att utvecklas till allvarliga hostanfall, som producerar som namnet antyder högfrekvent kiknande ljud i infekterade spädbarn och barn när de andas in luften efter hosta. Hostan varar i cirka sex veckor innan den klingar av. Förebyggande via vaccination är av största betydelse eftersom behandling är av liten klinisk nytta för den smittade personen. Antibiotika, emellertid, minskar varaktigheten av smittsamheten och rekommenderas därför i många länder. Pertussistoxinet (PT) är av stor betydelse för patogenesen av kikhosta. Det är ett verkligt exotoxin ansvarigt för många fysiologiska, immunologiska och farmakologiska effekter. Dessutom är Pertussistoxin mycket specifikt för B. pertussis i motsats till vissa andra exotoxiner av arten Bordetella. Serologi med bestämning av IgG mot PT har visats vara särskilt användbart för senare diagnos av äldre barn och vuxna.

PRINCIPEN FÖR TESTET

Analysen består av mikrotiterremsor belagda med höggradigt renat PT som antigen. I infekterade individer kommer de antikroppar som produceras mot PT att bindas till sitt antigen. Alkaliskt fosfatas-konjugerat anti-humant IgG kommer att binda till de humana antikropparna som är bundna till antigenet. När substratet tillsätts utvecklas en gul färg, vars intensitet (avläst i en fotometer), är proportionell mot mängden bundna antikroppar.

MATERIAL SOM TILLHANDAHÅLLS

En ram med mikrotiterremсор (12x8) brunnar belagda med PT antigen, förpackade i foliepåsen med torkmedel

Kontroller

PT IgG positiv kontroll. Bruksfärdig

1 flaska innehållande 1,5 ml, blå lösning

PT IgG negativ kontroll (märkt grön). Bruksfärdig

1 flaska innehållande 4,0 ml, blå lösning

Provspädningsbuffert. Bruksfärdig

2 flaskor innehållande 25 ml, blå lösning

Tvättbuffert

1 flaska innehållande 35 ml, 40 x koncentrerat

Konjugat

Anti-human IgG-konjugat. Bruksfärdigt

2 flaskor innehållande 6.0 ml, orange lösning

Substrattabletter

1 Remsa innehåller 6 x 1 tabletter

Substratbuffert

1 flaska innehållande 30 ml

Stopplösning

1 flaska innehållande 30 ml

MATERIAL/UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Spektrofotometer med filter 405 nm.
- Precisionspipetter med engångspetsar.
- Tvättare till ELISA-plattor, absorberande papper, rör och en timer.
- Inkubationsblock eller inkubator (37 °C).
- Icke-metalliska behållare för beredning av substratlösning.

REAGENSER

Alla reagenser ska ha nått rumstemperatur när de används.

Provutspädningsbuffert. Innehåller fosfatbuffrad saltlösning (PBS), 0,09% natriumazid.
Bruksfärdig

Tvättbuffert, 40 x koncentrerad. 29% natriumklorid, 2% Tween 20 och 0,09% natriumazid.
Späd före användning.

Kontroller

En PT IgG positivt humant serum och en PT IgG negativt humant serum. Alla sera har testats HBsAg och HIV- och HCV-antikropp negativt. Båda kontrollerna är färdiga att använda.

Konjugatet innehåller get-anti-humant IgG konjugerat med alkaliskt fosfatas.
Bruksfärdigt

Substrattabletter P-nitrofenylfosfat, 5 mg/tablett.

Observera! Kontakt med metall bör undvikas.

Substratbuffert Innehåller 1 M dietanolamin och 0,5 mM magnesiumklorid.
Bruksfärdig

Stopplösning Innehåller 0,4 M natriumhydroxid, EDTA, karbonat-buffert (pH >10). Låt inte reagentet komma i kontakt med huden. Bruksfärdig

SÄKERHET OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Allmänna

Serumprover som skall testas kan innehålla smittämnen och bör hanteras därefter.

Pipettera ej med munnen, rök, ät eller drick inte i områden där prover eller kitreagenser hanteras.

På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla varuinformationsblad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.

ELISA-platta

Mikrotiterremorna ska hanteras med försiktighet. För att undvika kontaminering av brunnar vidrör aldrig toppen av remsorna med fingrarna. Pipettera noggrant för att undvika repor på insidan av brunnen. Kontrollera luftbubblor i brunnar efter avslutad pipettering. Om de finns, ta bort dem genom att försiktigt knacka på ramen.

Positiv kontroll

Innehåller humant serum positivt för PT IgG. Bör betraktas som potentiellt smittsamt. Hantera med försiktighet. Testad negativa för HIV-och HCV antikropp och HBsAg.

Negativ kontroll

Innehåller humant serum negativt för PT IgG. Bör betraktas som potentiellt smittsamt. Hantera med försiktighet. Testade negativt för HIV-och HCV-antikropp och HBsAg.

Konjugat, prov utspädningsbuffert

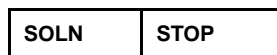
Innehåller biologiskt material. Hantera med försiktighet.

Stopplösning

Innehåller 0,4 M natriumhydroxid. Undvik kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Spill torkas med riklig mängd vatten. Om kontakt med hud eller ögon sker, skölj med vatten och kontakta läkare omedelbart.



Varning



Innehåller: Natriumhydroxid

- H315: Irriterar huden.
 H319: Orsakar allvarlig ögonirritation.
 P264: Tvätta händerna grundligt efter användning.
 P280: Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ ansiktsskydd.
 P302+352: VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
 P305+351 +338: VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
 P332+313: Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.
 P337+313: Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

Substratbuffer

Innehåller 9,7% Dietanolamine



SUBSBUF

Varning

Innehåller: Diethanolamine

- H319: Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264: Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280: Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ ansiktsskydd.
P305+351 VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja..
+338: Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.
P337+313: Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

LAGRINGSFÖRESKRIFTER

Allmänna

Förvara alltid testkit och dess innehåll vid 2-8 °C.

Testkit och dess innehåll bör ha nått rumstemperatur före användning.

ANVÄND INTE KITS ELLER KOMPONENTER SOM HAR PASSERAT UTGÅNGSDATUM.
BLANDA INTE REAGENSER MED OLIKA BATCHNUMMER.

Substratlösning

Beredd substratlösning bör användas inom samma dag.

Förvara mörkt vid rumstemperatur (20-23 °C).

Tvättlösning

Använd beredd tvättlösning inom 3 veckor. Förvara vid rumstemperatur (20-23 °C).

Mikrotiterremсор

Ta endast det antal remсор som behövs för testning, återförslut aluminiumfolie-påsen noggrant. Förvaras vid 2-8 °C.

BEREDNING AV REAGENSER

Alla reagenser ska ha nått rumstemperatur när de används.

Tvättlösning

Späd 1 flaska tvättbuffert (35 ml) till 1400 ml med destillerat vatten. Den framställda mängden tvättbuffertlösning är tillräcklig för 12 mikrotiterremсор och är hållbar under 3 veckor vid 20-23 °C.

Substratlösning

Förbered endast tillräcklig mängd för en dags användning (100 µl/ brunn).

1 substrattablett upplöses i 5 ml substratlösning.

Observera! Substratlösningen är hållbar i 1 dag. Förvara den framställda lösningen mörkt och inte över rumstemperatur.

TVÄTTINSTRUKTIONER

Börja alltid testproceduren genom att tvätta varje brunn fyra gånger.

Följ tvättinstruktionen noga eftersom ofullständig tvätt kan äventyra testresultatet.

Tvättningen kan utföras antingen genom automatisk mikrotiterplatt-tvättare eller manuellt.

Tvättning med automatisk tvättutrustning för mikrotiterplattor

När du använder automatisk platt-tvättutrustning, kontrollera att alla brunnar kan aspireras helt och att tvättbufferten når kanten av varje brunn under varje tvättcykel. Tvättaren ska programmeras för att utföra 4 tvättcykler.

Fortsätt direkt till nästa steg med reagenstillsats.

Manuell tvätt

1. Fyll alla brunnar med 0,3 ml tvättlösning.
 2. Låt de fyllda brunnarna stå i minst 30 sekunder.
 3. Töm brunnarna genom att vända mikrotiterplattan upp och ner följt av en bestämd kort vertikal rörelse.
 4. Denna tvättcykel (1, 2 och 3) bör utföras 4 gånger.
 5. Placera den upp- och nedvända plattan på absorberande pappershanddukar och knacka bestämt på plattan för att avlägsna rester av tvättlösning i brunnarna.
 6. Fortsätt direkt till nästa steg med reagenstillsats.
- Skrapa ej insidan av brunnarna.

INSAMLING AV PROV

Pertusscan PT IgG-analys är avsedd att användas med serum. Hantera som om smittämnen kan överföras. Undvik att använda sera som är ikteriska, lipemiska eller hemolyserade. Värmeinaktiverat serum kan ge ospecifika reaktiviteter och bör inte användas.

Förvara serum mellan 2-8 °C om testning kommer att ske inom fem dagar. Om prover skall förvaras under längre perioder, förvara vid -20 °C eller kallare. Använd inte frys med automatisk avfrostning eftersom den kan göra att proverna går igenom frys-upptining-cykler och bryter ned antikroppar. Prover som felaktigt lagras eller utsätts för flera frys-upptining-cykler kan ge falska resultat.

CLSI erbjuder rekommendationer om förvaring av blodprover (Godkända standard-rutiner för hantering och bearbetning av blodprover, H18A, 1990).

Parade prover

Den mest tillförlitliga metoden för att diagnostisera en pågående/ ny pertussis-infektion är genom att visa en betydande titerökning (= en fördubbling av absorbansvärdet) av IgG mellan akut och konvalescent prov.

En akut prov definieras som taget inom:

2-3 veckor för ovaccinerade barn

<7 dagar för vaccinerade barn och vuxna, efter symtomdebut.

Om det första provet har tagits senare än de angivna intervallen, kan en betydande ökning av titer inte regelbundet påvisas.

Single (konvalescent) prover

Pågående/ny kikhoste-infektion indikeras också av en förhöjd PT IgG (se cut-off under Tolkning) i konvalescenta prover, som definieras som ett prov som tas efter symtomdebut

- ≥ 3 veckor för ovaccinerade barn
- ≥ 10 dagar för vaccinerade barn och vuxna

Notera

Vaccination inom 1 år före provtagningen gör den serologiska diagnosen osäker.

TESTPROCEDUR

Testa alltid varje patientprov i dubletter.

Använd alltid de tillhandahållna bruksfärdiga positiva och negativa kontrollerna i duplikat vid varje testkörning.

Alla reagenser bör användas vid rumstemperatur (20-23 °C).

Vi rekommenderar att förbereda en blank med bara substratlösning. Detta görs enkelt genom att använda en tom brunn till vilken sättes substratlösning vid tillsats av substratlösning till de andra brunnarna.

1. Förbered tvättlösning. (Se under "Beredning av reagenser").
2. Förbered mängden substrat-lösning tillräckligt för en dags användning. (Se under "Beredning av reagenser").
3. Späd patientsera 1:500 (i dubletter) i provrör i två steg.
Steg I : 10 µl serum + 190 µl provspädningsbuffert.
Steg II : 15 µl serum från Steg I + 360 µl provspädningsbuffert.
4. Placera det lämpliga antalet remsor i ramen.
5. För att maximera aktiviteten av PERTUSSCAN PT IgG-analysen, börja alltid proceduren genom att tvätta varje brunn fyra gånger. (Se under "Tvättinstruktioner").
6. Pipettera 100 µl av varje bruksfärdig kontroll enligt följande.
PT IgG positiv kontroll.
Negativ kontroll (märkt grön).
a. SPÄD INTE KONTROLLERNA.
7. Pipettera 100 µl av varje nyligen förspätt patientserum i duplikat.
8. Inkubera under 60 minuter vid 37 °C.
9. Tvätta varje brunn fyra gånger. (Se under "Tvättinstruktioner").
10. Pipettera 100 µl av konjugatet i brunnarna.
SPÄD INTE KONJUGATET
11. Inkubera under 60 minuter vid 37 °C.
12. Tvätta varje brunn fyra gånger. (Se under "Tvättinstruktioner").
13. Pipettera 100 µl substratlösning i alla mikrotiterbrunnar.
14. Inkubera under 30 minuter vid 37 °C.
15. Pipettera 100 µl stopplösning i alla mikrotiterbrunnar.
16. Avläs absorbansvärden vid 405 nm.

Obs: Före beräkningen av testresultaten, bör OD-värdet av den tomma brunnen subtraheras från alla andra brunnar.

VALIDERING AV TEST

Beräkna medelvärdet av dubbla brunnar för varje kontroll.

	Mål OD (vid 405 nm)	Acceptabelt intervall
Positiva kontroller	1,00	0,77 - 1,43
Negativ kontroll	-	<0,3

BERÄKNING AV RESULTAT

För att korrigera för positiv kontroll som inte uppfyller målvärdet 1,0 måste en beräkning göras enligt följande:

$$\frac{\text{OD}_{\text{Provet}}}{\text{OD}_{\text{Positiv kontroll}}}$$

Det korrigerade OD från ekvationen används för tolkning av resultatet.

TOLKNING AV PERTUSSCAN PT IgG

(Se även "Insamling av prover").

Beräkna medelvärdet för alla dubbla patientprover.

Parade prover

En fördubbling av absorbans mellan första och andra prov representerar en betydande ökning av antikroppar.

En betydande ökning av anti-PT-IgG indikerar pågående/ nyligen genomgången infektion.

Single (konvalescent) prover

Ett prov, taget 4-6 veckor efter symtomdebut hos ett ovaccinerat barn och efter ≥ 10 dagar med symtom i ett vaccinerat barn eller en vuxen som visar en IgG titer:

$\geq 1,5$ indikerar starkt en pågående/ nyligen genomgången infektion (specificitet 99,1 %)
 $\geq 1,0$ indikerar en pågående/ nyligen genomgången infektion (specificitet 97,2 %)

Notera

- Absorbansvärdet för ett prov från en testkörning till en annan kan skilja sig något. Detta beror främst på en liten skillnad i testkörningar med avseende på pipetteringsteknik, temperaturen i inkubatorn och laboratorium och tidsfaktorn vid inkubationer.
- Vissa prov kanske inte är upprepat reaktiva. Vanliga orsaker är:
 - a. inkorrekt tvättning
 - b. användning av reagens med passerat utgångsdatum,
 - c. korskontaminering ("pick ups") från närliggande positiva mikrotiterbrunnar.
- En titer $\geq 1,5$ är diagnostisk för pågående/ nylig kikhosta endast om inget kikhostevaccin har givits inom 12 månader före blodprovstagning.
- Ett absorbansvärde över 0,3 indikerar närvaro av antikroppar
- Äldre individer (> 60 år) kan ha ej förhöjt PT IgG svar på en pågående/ nyligen genomgången infektion, men kan sedan diagnostiseras genom ett förhöjt FHA IgA ($\geq 0,6$) svar (Pertusscan TRO).
- Om ytterligare bekräftelse på ett förhöjt absorbansvärde av PT IgG vid $\geq 1,0 - < 1,5$ är indikerat då kan Pertusscan TRO användas:
 - pågående kikhosta kommer att bekräftas om också PT IgA och / eller FHA är förhöjt
- Cut-off gräns på 1,5 motsvarar ≥ 110 EU / mL mot FDAs standard Lot 3
Cut-off värde $\geq 1,0$ motsvarar ≥ 70 EU / mL
Cut-off värde 0,3 motsvarar 18 EU / mL

Pertusscan PT IgG testas mot NIBSC.

BEGRÄNSNINGAR

Testet bör inte användas som enda grund för beslut om klinisk behandling utan som ett komplement till kliniska symtom och resultat av andra tillgängliga tester.

PRESTANDA

Tabell 1. **Klinisk sensitivitet och specificitet.** Totalt 159 frysta retrospektiva sera. Följande tabell sammanfattar resultaten:

Kontroll och Sjukdomsgrupperna	Totalt antal	Positiv cut-off OD $\geq 1,5$	Positiv cut-off OD $\geq 1,0$
PT IgG positiva prover.	52	43	51
Rutinprover (icke-luftvägsinfektioner)	107	1	3

Klinisk sensitivitet: 52 prover från patienter med diagnosen Pertussis infektion testades för förhöjda PT IgG nivåer.

Cut-off OD $\geq 1,0$, sensitivitet 51/52 = 98,1% 95% CI = 89,7% - 100%

Cut-off OD $\geq 1,5$, sensitivitet 43/52 = 82,7% 95% CI = 69,7% - 91,8%

Klinisk specificitet: 107 rutinprover (icke-luftvägsinfektioner) testades.

Cut-off OD $\geq 1,0$, specificitet 104/107 = 97,2% 95% CI = 92,0% - 99,4%

Cut-off OD $\geq 1,5$, specificitet 106/107 = 99,1% 95% CI = 94,9% - 100%

95 % konfidensintervall (CI) beräknades med hjälp av den Exakta metoden.

Tabell 2. **Batch till batch variationen** bestämdes genom att testa tio olika prover i åtta replikat med tre olika batcher/satser.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Medel OD värde	0,43	0,12	0,07	0,20	0,76	1	1,23	0,89	2,12	1,86
SD	0,02	0,01	0,01	0,01	0,07	0,03	0,12	0,06	0,04	0,13
% CV	3,8	8,6	9,2	6,9	8,7	2,6	9,9	6,6	2,1	6,9

Tabell 3. **Inter-analys variation** bestämdes genom att testa tio olika prover i åtta replikat vid tre olika tillfällen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Medel OD värde	0,42	0,11	0,06	0,19	0,71	0,97	1,28	0,83	2,18	1,72
SD	0,01	0	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,02
% CV	1,5	2,7	4,6	3,6	1,7	1,6	1,7	3,8	2,4	0,9

Tabell 4. **Intra-analys variation** bestämdes genom att testa tio olika prover i åtta replikat vid ett tillfälle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Medel OD värde	0,42	0,11	0,06	0,2	0,72	0,98	1,3	0,86	2,15	1,7
SD	0,03	0	0	0,01	0,04	0,05	0,07	0,03	0,1	0,1
% CV	6,1	4,0	5,3	4,9	4,8	5,8	4,8	3,9	3,5	5,8

Felsökning

Problem:	Möjliga orsaker:	Lösning:
Kontrollvärden utanför intervallet.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Felaktig temperatur, tidpunkt eller pipettering, reagenser inte blandade. 2. Korskontaminering av kontroller. 3. Felaktig utspädning. 4. Optisk väg inte ren. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera att tiden och temperaturen var korrekt. Se "Dålig precision" nedan. Upprepa testet. 2. Pipettera noggrant. 3. Upprepa testet. 4. Kontrollera smuts eller luftbubblor i brunnarna. Torka botten och avläs igen.
Alla testresultat är negativa.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ett eller flera reagens tillsattes inte, eller tillsattes i fel ordning. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera proceduren igen. Kontrollera oanvända reagens. Upprepa testet.
Alla testresultat är gula.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontaminerade buffertar eller reagens. 2. Tvättilösning kontaminerad. 3. Felaktig utspädning av serum. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera alla lösningar för grumlighet. 2. Använd ren behållare. Kontrollera kvaliteten på vatten-lösningen som användts vid beredning. 3. Upprepa testet.
Dålig precision.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pipettens varians CV är större än 5%. 2. Serum eller reagens blandas inte tillräckligt eller är inte rumstempererade. 3. Tillsats av reagens tar för lång tid; inkonsekvens i tidsintervall. 4. Optisk väg inte ren. 5. Tvätt är inte konsekvent, bubblor är kvar, tvättilösningen kvar i brunnarna. 6. Felaktig pipettering. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera kalibrering av pipetten. Använd reproducerbar teknik. 2. Blanda alla reagenser försiktigt men noggrant och värm till rumstemperatur. 3. Utveckla konsekvent enhetlig teknik och använd multi-tipenheten eller autodispenserare för att minska tiden. 4. Kontrollera om det finns luftbubblor i brunnarna. Torka botten och avläs igen. 5. Kontrollera att alla brunnar är fyllda och aspirerade enhetligt. Fördela vätskan över nivån av reagens i brunnarna. Efter den sista tvätten, töm brunnarna genom att knacka på remsan på ett absorberande material. 6. Undvik luftbubblor i pipettspetsar.

REFERENSER

1. Cherry JD, et al. Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives. *Ped Inf Dis J* 2005; 24:S25-34
2. Dalby T, et al. Pertussis serology: assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *APMIS* 2010; 118:968-972
3. Diez-Domingo J, et al. Incidence of pertussis in persons \leq 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J Infection* 2004; 49:242-247
4. Granström G, Wretling B, Salenstedt CR, Granström M. Utvärdering av serologiska tester för diagnos av kikhosta. *J Clin Microbiol* 1988;1818-1823
5. Guiso N et al. 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
6. Hallander HO, et al. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. *APMIS* 2009; 117:912-922
7. Menzies SL et al. Development and Analytical Validation of an Immunoassay for Quantifying Serum Anti-Pertussis Toxin Antibodies Resulting from *Bordetella pertussis* Infection. *Glin Immunol Vaccine* 2009; 16:1781-1788
8. Riffelmann M, et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis* *J Clin Microbiol* 2010;48:4459-4463
9. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21:3542-3549

Förklaring av symboler.

	Satsnummer
	Katalognummer
	Använd före
	Temperaturbegränsning
	Biologiska risker
	Läs instruktionsmanualen
	In vitro diagnostisk medicinteknisk produkt
	Tillverkare
	Varning
 96	Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

Ag	Antigen (belagda remsor)
DIL	Provspädningsbuffert
WASHBUF 40x	Tvättbuffert, 40 x koncentrerad
KONTROLL -	PT IgG negativt serum
KONTROLL + PT IgG	PT IgG positivt serum
CONJ PT IgG	PT IgG-konjugat
SUBSBUF	Substratbuffert
SUBS TAB pNPP	Substrattabletter
SOLN STOP	Stopplösning (natriumhydroxid, 0,4 M)

EURO DIAGNOSTICA AB

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
 Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
 E-mail: info@eurodiagnostica.com
 www.eurodiagnostica.com