

NovaLisa™

Bordetella pertussis

IgM – ELISA



Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Bordetella pertussis in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Bordetella pertussis in Humanserum oder Plasma

Enzyme immunoassay pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre B.pertussis et la toxine de B.pertussis en sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgM per Bordetella Pertussis nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra Bordetella pertussis en suero o plasma humano

Imunoensaio enzimático para a determinação qualitativa de anticorpos IgM contra Bordetella pertussis em soro ou plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 12
Français:	Page	13 à 17
Italiano:	da Pagina	18 a 22
Espanol:	Página	23 a 27
Português:	Página	28 a 33

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía / Bibliografia	Page / Seite / Page / Pagina / Página/	34
--	---	----

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos / Legenda dos Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	35
--	--	----

Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procedure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	Page / Seite / Page/ Pagina / Página	36
---	---	----

Product Number: BOPM0030 (96 Determinations)

1. INTRODUCTION

Bordetella species are non-spore-forming encapsulated bipolar, coccoid (pale-staining) Gram-negative bacilli (about 0.3-0.5 µm thick and 1 µm long). The genus consists of the human parasites *B. pertussis* and *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica* and *B. avium* which cause enzootic infections in various wild and domestic animal species. *B. pertussis* is the classical exciter of pertussis and exists only in ill people; *B. parapertussis* causes 5-20% of a milder and often clinical unapparent form of pertussis. *B. bronchiseptica* has seldomly (eg close contact with animals) human pathogenic significance as opportunistic secondary exciter in mixed infections (bronchitis, pneumonia, wound infection).

Pertussis or whooping cough is a bacterial infection of the respiratory system. It is a highly contagious childhood disease which appears seldomly under adults. It is transmitted by respiratory contact. *B. pertussis* has the ability to stick to the cilia of the epidermal cells of the respiratory system. Fragments of the bacterial cell wall (ExoToxin = tracheal Cytotoxine, TCT) inhibit the movement of the cilia in the tracheal mucosa. After an incubation time of one to three weeks the disease runs through three stages (s. table below). The lethality is 0.6 % and concerns babies in the first six months with more than 70 %. For newborn and premature infants it is higher (1-2%). In Africa beside measles virus *B. pertussis* is the main reason for high infant mortality. The distribution of the disease is worldwide.

Clinical pertussis is followed by natural acquired immunity which is long-lasting but not permanent. In most countries an active vaccination is recommended which leads to 90% protection for three to twelve years. Usually the immunization preparation is combined with diphtheria and tetanus toxoids.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of infection
<i>Bordetella pertussis</i>	Pertussis whooping cough	<p><u>1. Stadium catarrhale</u>: symptoms of a cold with slight fever (1-2 weeks)</p> <p><u>2. Stadium convulsivum</u>: severe, spasmodic coughing; after deep inspiration follows a coughing staccato with protruded tongue (2-6 weeks)</p> <p><u>3. Stadium decrementi</u>: Ease of disease with symptoms of a bronchitis (up to 6 weeks)</p>	<p>Highly contagious droplet infection</p> <p>Humans are the only reservoir of <i>B. pertussis</i></p> <p>Incubation time: 1-3 weeks</p>

The presence of bacterium resp. infection may be identified by

- Microscopy: identification on cultures, IF
- Serology: Detection of antibody production by ELISA

Precise diagnosis is needed for effective treatment of patients, for isolation of unvaccinated infants at risk, and for differentiation of pertussis from atypical diseases and chronic infections.

2. INTENDED USE

The NovaTec *Bordetella pertussis* IgM-ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against *Bordetella pertussis* and *Bordetella pertussis* **toxin** in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies against *Bordetella pertussis* is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with *Bordetella pertussis*/toxin antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgM conjugate is added. This conjugate binds to the captured *Bordetella pertussis*/toxin specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of *Bordetella pertussis*/toxin specific IgM antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- ***Bordetella pertussis* Coated Wells (IgM)**: 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with *Bordetella pertussis* antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent *****: 1 bottle containing 100 ml of ready to use buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; white cap.
- **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 ml. Ready to use sulphuric acid, 0.2 mol/l; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.)***: 1 bottle each containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.

- **Bordetella pertussis anti-IgM Conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgM; coloured red, Ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Bordetella pertussis IgM Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Bordetella pertussis IgM Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Bordetella pertussis IgM Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Bordetella pertussis antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Bordetella pertussis anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human-IgM horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. IgM Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, anti human-IgG, stabilizers, preservatives and an inert green dye. It is used for the dilution of the patient specimen. The solution contains antihuman IgG class antibodies to eliminate competitive inhibition from specific IgG class antibody to remove rheumatoid factor. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown. After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. After first opening stability until expiry date.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1 ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

- | | | |
|---------|--------------|-----------------------------|
| 1 well | (e.g. A1) | for the substrate blank, |
| 1 well | (e.g. B1) | for the negative control, |
| 2 wells | (e.g. C1+D1) | for the cut-off control and |
| 1 well | (e.g. E1) | for the positive control. |

It is left to the user to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100µl Bordetella pertussis anti-IgM Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.

Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in NovaTec Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$$

Example: $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-off :	10	NTU	
Grey zone:		9-11	NTU
Negative:	<9	NTU	
Positive:	>11	NTU	

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	12	0.85	9.4
	12	2.25	8.2
<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	20	0.44	8.5
	24	1.04	14.0

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is >95 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is 84.2 %.

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunosuppressed patients and newborns serological data only have restricted value.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: BOPM0030 Bordetella pertussis IgM-ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Bordetellen sind strikt aerobe, kleine kokkoide oder ovoide, gramnegative, bekapselte Stäbchen, die keine Sporen bilden. Man kennt vier Bordetella-Arten: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. avium*. *B. pertussis* ist der klassische Erreger des Keuchhustens und kommt nur beim Kranken vor; *B. parapertussis* verursacht 5-20 % der Pertussisfälle, wobei die Erkrankung dann milder, oftmals klinisch inapparent verläuft. Die beiden anderen Spezies treten vor allem als Erreger respiratorischer Erkrankungen bei warmblütigen Tieren in Erscheinung. Allerdings hat auch *B. bronchiseptica* in seltenen Fällen (z. B. bei engem Kontakt mit Tieren) eine humanpathogene Bedeutung als opportunistischer Sekundärerreger bei Mischinfektionen (z. B. Bronchitis, Pneumonie, Wundinfektionen). Keuchhusten (Pertussis) ist eine akute bakterielle Infektion der Atemwege mit sehr hoher Kontagiosität. Es handelt sich um eine typische Kinderkrankheit, sie ist beim Erwachsenen seltener. Die Infektion erfolgt durch Tröpfchen aus dem Respirationstrakt Kranker. *B. pertussis* besitzt die Fähigkeit, sich an die mit Zilien versehenen Epithelzellen der Atemwege anzuhängen. Fragmente aus der Bakterienzellwand verhindern als ExoToxin (tracheales Zytotoxin, TCT) die Zilienbewegung der Trachealschleimhaut. Nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Wochen verläuft die Erkrankung in drei Stadien (s. Tab.). Die Letalität liegt bei 0,6 % und betrifft in mehr als 70 % Säuglinge im ersten halben Jahr. Sie liegt bei Neu- und Frühgeborenen höher (1-2 %). In Afrika ist *B. pertussis* neben dem Masernvirus hauptverantwortlich für die hohe Kindersterblichkeit. Die Krankheit ist weltweit verbreitet. Sie hinterlässt keine absolute Immunität, Zweiterkrankungen sind möglich.

Die Impfung mit Ganzkeim-Vakzinen führt zu einem fast 90 % Schutz, der allerdings nur drei bis zwölf Jahre anhält. In der Regel ist eine Kombinationsimpfung mit Diphtherie und Tetanus möglich.

Spezies	Erkrankung	Symptome	Infektionsmodus
<i>B. pertussis</i>	Keuchhusten (Pertussis)	<p>1. Stadium catarrhale: Symptome einer Erkältung mit mäßigem Fieber. Dauer 1-2 Wochen.</p> <p>2. Stadium convulsivum: typische, schwere, krampfartige Hustenanfälle; nach einer tiefen Inspiration erfolgt ein Hustenstakkato mit Herausstrecken der Zunge. Dauer 2-6 Wochen.</p> <p>3. Stadium decrementi: Abklingen der Krankheit unter den Symptomen einer Bronchitis. Dauer bis zu 6 Wochen.</p>	<p>Tröpfcheninfektion mit hoher Kontagiosität</p> <p>Der Mensch ist das einzige Reservoir von <i>B. pertussis</i>.</p> <p>Inkubationszeit: 1 – 3 Wochen</p>

Nachweis

- Mikroskopie: Nachweis in Zellkulturen, IF
- Serologie: Nachweis von Antikörpern mittels ELISA

Eine präzise Diagnostik ist notwendig für die effektive Behandlung des Patienten, die Isolation von ungeimpften Risikokindern und für die Differenzierung zwischen Keuchhusten und atypischen Krankheiten und chronischen Infektionen.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Bordetella pertussis IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Bordetella pertussis in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen *B. pertussis* und *B. pertussis* Toxin beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit *B. pertussis* Toxin und filamentösem Hämagglutinin. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. HRP-konjugierte Antihuman IgM-Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit TMB-Substrat nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- ***B. pertussis* beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit *B. pertussis* Toxin und filamentösem Hämagglutinin; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; enthält anti-IgG Antikörper; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.

- **Waschlösung (20x konz.)***: 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
 - **B. pertussis anti-IgM-Konjugat****: 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen humanes IgM; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
 - **TMB-Substratlösung**: 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
 - **B. pertussis IgM Positiv-Kontrolle*****: 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
 - **B. pertussis IgM Cut-off Kontrolle*****: 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
 - **B. pertussis IgM Negativ-Kontrolle*****: 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- * enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung
 ** enthält 0.2 % Bronidox L
 *** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschorruchtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit B. pertussis Toxin und filamentösem Hämagglutinin beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. B. pertussis anti-IgM Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgM-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten grünen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung enthält anti-human-IgG-Antikörper, um den Proben spezifische IgG-Anteile sowie IgG-gebundene Rheumafaktoren zu entziehen. Sie wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt und ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6 TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschritte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1°C einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

***Beachte:** Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

5. 100µl B. pertussis anti-IgM Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.

6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB Substratlösungszugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgM-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200 und < cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionwerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: 0.37 OD Cut-off Kontrolle + 0.39 OD Cut-off Kontrolle = 0.76 : 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = \underline{0.38}$$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

Mittlere Extinktion der Patientenprobe x 10 = [NovaTec-Einheiten = NTU]
 Cut-Off

Beispiel: $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32$ NTU (NovaTec Units)

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	12	0.85	9.4
	12	2.25	8.2

Intraassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	20	0.44	8.5
	24	1.04	14.0

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >95 %.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 84,2 %.

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: BOPM0030 Bordetella pertussis IgM ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUCTION

Les espèces de Bordetella sont des bactéries (d'environ 0.3-0.5 µm d'épaisseur et 1 µm de longueur) bipolaires, encapsulées coccoïdes et Gram-négatives, qui ne forment pas de spores. Le genre comprend les parasites humains B. pertussis, B. parapertussis et B. bronchiseptica, qui cause des infections enzootiques dans diverses espèces d'animal sauvage et domestique.

Chez l'homme, B. pertussis produit une maladie connue sous le nom de pertussis ou coqueluche. C'est une maladie d'enfance, fortement contagieuse (environ 80 % des cas se produisent avant l'âge de 5 ans) qui est transmise par le contact respiratoire et est associée à un taux élevé de mortalité (environ 1-2% durant la première année de la vie, plus tard environ 1‰).

Sans immunisation, presque personne n'échappe au pertussis. Le pertussis clinique est suivi d'une immunité acquise naturellement, qui est durable mais non permanente. La distribution de la maladie est mondiale, cependant clairement modifiée par l'immunisation et d'autres facteurs (mal définis) sociaux, économiques et alimentaires. Dans la plupart des pays, une vaccination est combinée avec l'immunisation contre la diphtérie et le tétanos.

Espèce	La maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
B. pertussis	Pertussis ; coqueluche	Phase catarrhale: maladie avec des symptômes non spécifiques comprenant la toux aggravée, symptômes nasaux, fièvre légère ; Phase paroxysmale : toux grave et paroxysmale	Infection de gouttelettes : attachement des bactéries aux cils trachéaux et bronchiques, ce qui mène à la perte de fonction et à la destruction des cils ; période d'incubation : 7-14 jours

La présence des bactéries peut être identifiée par :

- Microscopie : identification par culture de cellules, IF
- Sérologie : Détection de production d'anticorps par ELISA

Un diagnostic précis est nécessaire pour le traitement efficace des patients, pour l'isolement des enfants non vaccinés en danger, et pour la différenciation du pertussis des maladies atypiques et des infections chroniques.

2. UTILISATION PRÉVUE

L'ELISA d'IgM de B.pertussis de NovaTec est prévu pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre B. pertussis et la toxine de B. pertussis en sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DE L'ANALYSE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgM contre B. pertussis et la toxine de B. pertussis est basée sur la technique d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Des puits dans les bandes du plaque microtitre sont recouverts d'antigènes de la toxine de B.pertussis et filaments Hémagglutinine pour attacher les anticorps correspondants du spécimen. Après le lavage des puits ayant pour but d'enlever l'échantillon détaché, l'anti-humain IgM conjugué à HRP (horseradish peroxidase) est ajouté. Ce conjugué s'attache aux anticorps spécifiques pour le B. pertussis. Le complexe immunitaire constitué par le conjugué attaché est visualisé en ajoutant le substrat de Tetraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM spécifiques pour le B.pertussis dans le spécimen. De l'acid sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA.

4. MATÉRIAUX

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts de B. pertussis (IgM) :** 12 bandes cassables contenant 8 puits recouvertes d'antigène de la toxine de B. pertussis et filaments Hémagglutinine; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgM *** :** 1 bouteille contenant 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré vert ; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution D'Arrêt :** 1 bouteille contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (20x concentré.) * :** 1 bouteille contenant 50 ml d'un amortisseur 20-fois concentré (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; couvercle blanc.
- **Conjugué anti-IgM B. pertussis ** :** 1 bouteille contenant 20 ml d'anticorps de lapin conjugués à peroxydase contre l'IgM humain ; coloré rouge, prêt à utiliser ; couvercle noir.
- **Solution de substrat de TMB :** 1 bouteille contenant 15 ml 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à utiliser ; couvercle jaune.
- **Contrôle positif d'IgM B. pertussis *** :** 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.

- **Contrôle cut-off d'IgM B. pertussis ***** : 1 bouteille contenant 3 ml, coloré jaune; prêt à utiliser; couvercle vert.
 - **Contrôle négatif d'IgM B. pertussis *****: 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle bleu.
- * contient 0.1 % de Bronidox L après dilution
 ** contient 0.2 % de Bronidox L
 *** contient 0.1 % de Kathon

4.2. Matériaux fournis

- 1 support de bande
- 1 couverture autocollante
- 1 protocole d'essai
- 1 plan de distribution et d'identification

4.3. Matériaux et équipement requis

- lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA, équipé pour le mesurage de l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur 37°C
- Équipement manuel ou automatique pour rincer les puits
- Pipettes pour usage entre le 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (fraîchement) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITÉ ET STOCKAGE

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'échéance indiquée sur l'étiquette une fois stockés à 2... 8°C.

6. PRÉPARATION DE RÉACTIF

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient à la température de la pièce (20... 25°C) avant de commencer l'analyse!

6.1. Bandes recouvertes cassables

Les bandes cassables sont recouvertes d'antigène de la toxine de B.pertussis et filaments Hémagglutinine et sont prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après avoir détaché des bandes, les bandes restantes devraient tout de suite être refermées dans le sachet d'aluminium avec le desiccant fourni et être conservées à 2... 8°C; stable jusqu'à la date d'échéance. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.2. Conjugué anti-IgM B. pertussis

La bouteille contient 20ml d'une solution avec de la peroxydase de raifort anti-humaine-IgM, l'amortisseur, les stabilisateurs, les préservatifs et un colorant rouge inerte. La solution est prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.3. Contrôles

Les bouteilles marquées avec contrôle positif, contrôle cut-off et contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prêt à utiliser. Elle contient 0.1% Kathon et doit être stockée à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2...8°C.*

6.4. Diluant de l'échantillon IgM

Le bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, d'IgG anti-humain, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant vert inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. La solution contient des anticorps IgG anti-humains pour éliminer l'inhibition compétitive des anticorps IgG spécifiques pour ainsi enlever le facteur rhumatoïde. Cette solution prête à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.5. Solution de lavage (20x conc.)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. *Le tampon dilué est stable pendant cinq jours si conservé à +2...+8°C. Le tampon concentré reste stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé à +2...+8°C. Les cris taux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat de TMB

La bouteille contient 15ml d'un système de peroxyde de tetramethylbenzidine/hydrogen. Le réactif est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C, loin de la lumière. *La solution devrait être sans couleur ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat se transforme en bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

La bouteille contient 15ml d'une solution acide sulfurique de 0.2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

7. COLLECTION ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

Utilisez des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si l'analyse est exécutée dans un délai de 5 jours après la collection de l'échantillon, le spécimen devrait être maintenu à 2... 8°C ; autrement ils devraient être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, mélangez les échantillons décongelés bien avant l'analyse. *Évitez congélation et décongélation répétée.*

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant l'analyse, tous les échantillons devraient être dilués 1+100 avec le diluant de l'échantillon IgM.

Diluer 10µl de l'échantillon avec 1ml du diluant de l'échantillon IgM dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger celle-ci soigneusement par un Vortex.

8. PROCÉDÉ D'ANALYSE

8.1. Préparation d'analyse

Veuillez lire le protocole de l'analyse soigneusement **avant** d'exécuter l'analyse. La fiabilité des résultats dépend de l'adhérence stricte au protocole de l'analyse comme décrit. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer l'analyse, le plan de distribution et d'identification pour tous les spécimens et contrôles devrait être soigneusement établi sur la feuille de résultat fournie dans le kit. Choisissez le nombre requis de bandes ou de puits microtitres et insérez-les dans le support.

Veuillez assigner au moins :

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 puits (par exemple A1) | pour le blanc substrat, |
| 1 puits (par exemple B1) | pour le contrôle négatif |
| 2 puits (par exemple C1+D1) | pour le contrôle cut-off et |
| 1 puits (par exemple E1) | pour le contrôle positif. |

C'est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient deux fois, si nécessaire.

Exécutez toutes les étapes de l'analyse dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Une pointe de pipette propre et jetable devrait être employée pour aliquoter chaque contrôle et échantillon.

Ajuster l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipettez 100µl de contrôles et les échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Gardez le puits A1 pour le substrat blanc.
2. Couvrez les puits de couvertures autocollantes.
3. **Incuber pour 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. Quand l'incubation a été accomplie, enlevez la couverture, aspirez le contenu des puits et lavez chaque puits trois fois avec 300µl de solution de lavage. Évitez les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5sec. À la fin, enlevez soigneusement le fluide restant en tapant les bandes sur des papiers en tissu avant la prochaine étape !
Note : Le lavage est décisif ! Un lavage insuffisant peut mener à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.
5. Pipettez 100µl du conjugué anti-IgM B.pertussis dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermez avec la couverture autocollante.
6. **Incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce. Ne pas exposer à la lumière du soleil directe.**
7. Répétez l'étape numéro 4.
8. Pipetter 100µl de la solution de substrat de TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité.**
10. Pipetter 100µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat de TMB.
N'importe quelle couleur bleue développée pendant l'incubation se transforme en jaune.
Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés de chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de la densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec la solution physiologique de chlorure de sodium, par exemple 1+1. Ensuite diluer l'échantillon 1+100 avec l'amortisseur et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.
11. Mesurer l'absorption du spécimen à 450/620nm dans un délai de 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesurage

Ajuster le lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1.

Si - pour raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorption du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorption mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorption de tous les puits à 450 nm et enregistrer les valeurs d'absorption pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture bichromatique de longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est recommandée.

En cas de plusieurs mesurages, calculer les valeurs moyennes d'absorption de tous les résultats.

9. RÉSULTATS

9.1. Critères De Validité

Afin qu'une analyse soit considérée valide, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < 0,100.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < 0,200 et < cut-off
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1 : Valeur d'absorbance 0,150 – 1,30
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance > contrôle seuil (cut-off).

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple : $0,37 \text{ DO cont. seuil} + 0,39 \text{ DO cont. seuil} = 0,76 \div 2 = 0,38$
« Cut-off » = 0,38

9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorption est plus élevée que 10% au-dessus du « cut-off ».

Des échantillons avec une valeur d'absorption de 10% au-dessus ou au-dessous du « cut-off » ne devraient pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est recommandé de répéter l'analyse après 2 - 4 semaines avec un échantillon frais. Si les résultats de la deuxième analyse sont encore dans la zone grise l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorption est inférieure à 10% au-dessous du « cut-off ».

9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorption du patient x 10 = [unités NovaTec = NovaTec units= NTU]
« cut-off »

Exemple : $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU}$

« Cut-off » : 10 NTU
Zone grise : 9-11 NTU
Négatif : < 9 NTU
Positif : > 11 NTU

10. CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

10.1. Précision

<u>Intera-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	12	0.85	9.4
	12	2.25	8.2
<u>Intra-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	20	0.44	8.5
	24	1.04	14.0

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >95%.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 84.2%.

10.4. Interférence

Aucune interférence n'a été observée sur des sérums hémolytiques, lipémiques ou ictériques pour des concentrations allant jusqu' à 10 mg/ml d' hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0.2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

12. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : Dans la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique lors du contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. Lors du contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

12.1. Mesures d'élimination

Les résidus de réactifs et des préparations sont considérés comme de déchets potentiellement dangereux. L'élimination de ces déchets est soumise à des réglementations nationales et locales. Contacter les autorités locales ou les sociétés spécialisées pour obtenir des conseils sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION DE COMMANDES

Numéro de Produit : BOPM 0030 Bordetella pertussis IgM-ELISA (96 déterminations)

1. INTRODUZIONE

Le Bordetelle sono batteri aerobi obbligatori, Gram negativi, asporigeni e capsulati. Esistono quattro specie diverse: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *B. pertussis* è il classico agente eziologico della pertosse. Il 5-20% dei casi viene causata da *b. paraperutssis* con sintomi lievi oppure asintomatica. *Bordetella avium* e *bordetella bronchiseptica* in genere non sono patogeni per gli essere umani. La pertosse è una infezione acuta e molto contagiosa delle vie respiratorie. È una tipica malattia dell'età scolare, a contagio diretto attraverso goccioline di saliva e secrezioni nasali. L'uomo è l'unico serbatoio noto del batterio, di conseguenza la trasmissione della malattia avviene solo fra esseri umani. Il quadro tipico è caratterizzato da una fase di incubazione che dura 15-20 giorni, seguita da una fase catarrale della durata di due settimane, e infine da una fase accessoriale di altre due o tre settimane. Nei bambini piccoli, le complicazioni più gravi sono costituite da sovra infezioni batteriche, che possono portare a otiti, polmonite, bronchiti, o addirittura affezioni neurologiche (crisi convulsive, encefaliti). I colpi di tosse possono anche provocare delle emorragie sotto congiuntivali e nel naso. Oggi il 90% dei casi di pertosse si registrano proprio nelle popolazioni in cui non viene effettuata la vaccinazione, e in questi casi la pertosse può portare a una mortalità elevata nei bambini. Il vaccino lascia una immunità del 90% che dura da 3 a 12 anni.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
B. pertussis	Pertosse	Tre stadi: 1. stadio catarrale: catarro, febbre, inappetenza; 1-2 settimane 2. stadio convulsivo: colpi di tosse spesso seguiti da una perdita di sangue dal naso e dalla bocca; 2-6 settimane 3. stadio decrementi: i sintomi si attenuano lentamente; circa 6 settimane	Trasmissione aerea..

Diagnosi

- Microscopia: Coltura cellulare
- Sierologia: ELISA

2. USO PREVISTO

Il NovaTec *Bordetella pertussis* IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per *Bordetella pertussis* nel siero o plasma (citrato) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per *Bordetella pertussis* e la sua tossina si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con adesi la tossina della *Bordetella pertussis* ed emoagglutinina filamentosa. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgG umane) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per la *Bordetella Pertussis* di classe IgG presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni dell *Bordetella pertussis* (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi la tossina della *Bordetella pertussis* ed emoagglutinina filamentosa; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgM***:** 1 fialone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color verde; pronto all'uso; tappo bianco; contiene anticorpi anti IgG umani.
- **Soluzione stop:** 1 fialone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):*** 1 fialone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato *Bordetella pertussis* anti IgM**:** 1 fialone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgM umane, coniugati a perossidasi; color rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 fialone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- ***Bordetella pertussis* IgM Controllo positivo***:** 1 fialone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- ***Bordetella pertussis* IgM Controllo Cut-off***:** 1 fialone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- ***Bordetella pertussis* IgM Controllo negativo***:** 1 fialone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

- * contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione
- ** contiene 0.2 % Bronidox L
- *** contiene 0.1 % Kathon

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2...8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20...25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi la tossina della Bordetella pertussis ed emoaagglutinina filamentosa. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8°C.*

6.2. Coniugato Bordetella pertussis IgM

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgM umane coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte rosso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8°C.*

6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8°C.*

6.4. Tampone diluente IgM

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante verde inerte. La soluzione contiene anticorpi anti IgG umani per togliere dagli campioni gli anticorpi specifici della classe IgG ed i fattori reumatici legati ad anticorpi IgG. Viene usata per diluire i campioni. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8°C.

6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8°C.*

6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8°C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (citrato) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.*
L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a 37° ± 1°C

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora ± 5 min a 37° ± 1°C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falso della densità ottiche.

5. Pipettare 100 µl di Coniugato Bordetella Pertussis anti-IgM in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20°...25°C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20°...25°C) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1+100 con tampone diluente IgM. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) **a zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza **< 0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza **< 0.200 e < cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza **>Cut-Off**

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off è la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38

$$\text{Cut-Off} = \underline{0.38}$$

9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso è raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato è ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unità NovaTec} = \text{NTU}]$

Esempio: $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

Interdosaggio	n	Media	Cv (%)
Siero pos.	12	0.85	9.4
	12	2.25	8.2
Intradosaggio	n	Media	CV (%)
Siero pos.	20	0.44	8.5
	24	1.04	14.0

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a >95 %.

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è pari a 84.2%.

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: BOPM0030 Bordetella pertussis IgM-ELISA (96 determinazioni)

1. INTRODUCCIÓN

Las Bordetellas son pequeñas bacterias cocoicas u ovoides aerobias gramnegativas con cápside que no producen esporas. El genero Bordetella incluye 4 tipos: B. pertussis, B. parapertussis, B. bronquiseptica y B. Avium. B. pertussis es el patógeno clásico de la tos ferina. B. parapertussis causa del 5-20 % de los casos de tos ferina, provocando en general un cuadro clínico más leve que pasa muchas veces inadvertido. Las otras dos especies aparecen sobre todo en infecciones respiratorias de animales de sangre caliente. No obstante B. bronquiseptica tiene un efecto patógeno secundario en pocos casos para el hombre (p.e. contacto intensivo con animales) en infecciones mixtas (p.e. bronquitis, pneumonia, infecciones de heridas).

La tos ferina es una infección respiratoria bacteriana aguda de alto nivel de contagio típica para la infancia que se transmite por gotas de fluido contaminado del tracto respiratorio de enfermos. El hombre es el único depósito de germen patógeno.

B. pertussis tiene la capacidad de adherirse a los cilios del epitelio respiratorio. Varias toxinas inhiben el movimiento de los cilios traqueales, dañan el epitelio local y facilitan el desarrollo de la infección. Después de un tiempo de incubación de 1-3 semanas la enfermedad se desarrolla en tres etapas (ver el cuadro). La letalidad es de 1-2% el primer año de vida, después aproximadamente de 1%. Las complicaciones posibles son infecciones pulmonarias con Neumococos o Hemofilus y otitis media.

La infección provoca una inmunidad natural profunda pero no absoluta, las infecciones secundarias son posibles. La enfermedad afecta a la población mundial, modificada por factores sociales, económicos y nutritivos poco descritos. En gran parte del mundo se recomienda una vacuna inactiva, normalmente en combinación con difteria y tetano.

Especies	Enfermedad	Síntomas	Vía de transmisión
B. pertussis	Tos ferina	<p>Desarrollo en tres etapas</p> <p><u>1. Estadio catarral</u>: síntomas de un catarro con fiebre leve; duración 1-2 semanas</p> <p><u>2. Estadio convulsivo</u>: ataques de una tos convulsiva típica y grave, después de una inspiración profunda con lengua fuera; duración 2-6 semanas.</p> <p><u>3. Estadio decreciente</u>: mejora bajo los síntomas de una bronquitis; duración hasta 6 semanas</p>	<p>gotitas de fluido contaminado</p> <p>el hombre es el único depósito de germen patógeno</p> <p>tiempo de incubación 1-3 semanas</p>

La bacteria puede ser detectada por:

- Microscopia: Detección en cultura, IF
- Serología: Detección de anticuerpos a través de ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima de Nova Tec se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Bordetella pertussis en suero o plasma (citato) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra Bordetella pertussis se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de Bordetella pertussis. Los anticuerpos existentes en la muestra se unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgM anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgM) recubiertas de antígeno de Bordetella pertussis:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertas con antígenos de Bordetella pertussis, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente de muestra IgM:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; contiene IgG anti humana; pH 7.2 ± 0.2; color verde; listo para el uso; tapón blanco.

- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para el uso; tapa roja.
 - **Solución de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
 - **Conjugado IgM anti-humano (Bordetella pertussis)**:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa; color rojo; tapa negra; listo para el uso.
 - **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para el uso; tapa amarilla.
 - **Control positivo de IgM (Bordetella pertussis)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para el uso.
 - **Control cut-off de IgM (Bordetella pertussis)***:** 1 botella de 3ml; color amarillo; tapa verde; listo para el uso.
 - **Control negativo de IgM (Bordetella pertussis)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para el uso.
- * contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir
 ** contiene 0.2% Bronidox L
 *** contiene 0.1% Catón

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!

6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de Bordetella pertussis. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2. Conjugado de IgM anti-humano (Bordetella pertussis)

La botella contiene 20ml de una solución de IgM anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante rojo inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.3. Controles

Las botellas de los controles contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.4. Diluyente de muestra IgM

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante verde inerte se utiliza para la dilución de la muestra del paciente. La solución contiene anticuerpos del tipo IgG anti-humanos para eliminar la inhibición competitiva de los anticuerpos de la clase IgG específicos y para retirar el factor reumatoide. Esta solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado entre 2...8°C.*

6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(z.B. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(z.B. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(z.B. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(z.B. D1)	para el control positivo

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C

1. Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h ± 5 min a 37°C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla **tres veces** con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!

5. Pipetar 100µl de conjugado anti-IgM (Bordetella pertussis) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetear 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.

9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C).**
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*
- Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgM 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.*
11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción **< 0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción **< 0.200 y < cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción **>cut-off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los volores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

Cut-off= 0,43

9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción $\pm 10\%$ del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10 / Cut-Off = [NovaTec-Einheiten = NTU]

Ejemplo: $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Zona intermedia:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

Inter ensayo	n	Promedio (NTU)	CV (%)
Suero equivoco	12	8.5	9.4
Suero pos	12	2.25	8.2

Intra ensayo	n	Promedio (OD)	CV (%)
Suero pos.	20	0.44	8.5
Suero pos	24	1.04	14.0

10.2. Especificad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente (>95 %).

10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico (84.2 %).

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtitulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- Il Novalisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ADVERTENCIA: Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

ADVERTENCIA: El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: BOPM0030 Bordetella pertussis IgM-ELISA (96 determinaciones)

1. INTRODUÇÃO

As espécies *Bordetella* são cocobacilos (de coloração pálida) Gram negativos (com cerca de 0,3-0,5 µm de espessura e 1 µm de comprimento) não esporulados, encapsulados, bipolares. O género consiste nos parasitas humanos *B. pertussis* e *B. parapertussis*, e *B. bronchiseptica* e *B. avium*, que causam infecções enzoóticas em várias espécies animais selvagens e domésticas. O *B. pertussis* é o agente clássico da pertussis e existe apenas em indivíduos doentes, o *B. parapertussis* causa 5-20% de uma forma mais moderada e, muitas vezes, clinicamente pouco nítida de pertussis. O *B. bronchiseptica* raramente (por exemplo, em contacto próximo com animais) tem significado patogénico humano como agente secundário oportunista em infecções mistas (bronquite, pneumonia, infecção de ferimentos).

A pertussis ou tosse convulsa é uma infecção bacteriana do sistema respiratório. Trata-se de uma doença infantil altamente contagiosa, que raramente se manifesta nos adultos. É transmitida por contacto respiratório. O *B. pertussis* tem a capacidade de se agarrar aos cílios das células epidérmicas do sistema respiratório. Fragmentos da membrana da célula bacteriana (ExoToxin = citotoxina traqueal, TCT) inibem o movimento dos cílios na mucosa traqueal. Após um período de incubação de uma a três semanas, a doença atravessa três fases de evolução (ver tabela abaixo). A taxa de mortalidade é de 0,6% e refere-se em mais de 70% a bebés nos primeiros seis meses de vida. Para bebés recém-nascidos e prematuros essa taxa é mais elevada (1-2%). Em África, além do vírus do sarampo, o *B. pertussis* é a principal causa de elevada mortalidade infantil. A distribuição da doença é mundial.

A pertussis clínica é seguida de uma imunidade natural adquirida, que é prolongada, mas não permanente. Na maioria dos países é recomendada uma vacinação activa, que produz 90% de protecção durante três a doze anos. Geralmente, o preparado de imunização é combinado com toxóides da difteria e do tétano.

Espécie	Doença	Sintomas	Mecanismo de Infecção
<i>Bordetella pertussis</i>	Pertussis tosse convulsa	1. Fase catarral: Sintomas de constipação com febre ligeira (1-2 semanas) 2. Fase paroxística: Tosse espasmódica severa; após uma inspiração profunda segue-se um acesso de tosse com produção de ruído agudo (2-6 semanas) 3. Fase de convalescença: Abrandamento da doença com sintomas de bronquite (até 6 semanas)	Infecção altamente contagiosa transmitida por via aérea Os seres humanos são o único reservatório de <i>B. pertussis</i> Período de incubação: 1-3 semanas

A presença da bactéria ou da infecção, respectivamente, pode ser identificada por

Microscopia: Identificação em culturas, IF

Serologia: Detecção da produção de anticorpos através do método ELISA

É necessário um diagnóstico preciso para o tratamento eficaz dos pacientes, para o isolamento de bebés não vacinados em risco e para distinguir a pertussis de doenças atípicas e infecções crónicas.

2. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O NovaTec *Bordetella pertussis* IgM-ELISA destina-se à determinação qualitativa de anticorpos da classe IgM contra *Bordetella pertussis* no soro ou plasma (citrato) humanos.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática qualitativa de anticorpos da classe IgM contra *Bordetella pertussis* baseia-se na técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Os poços das tiras de microtitulação estão revestidos com antígenos do *Bordetella* para se ligarem aos anticorpos correspondentes da amostra. Após a lavagem dos poços para retirar todo o material da amostra não ligado, é adicionado conjugado anti-IgM humana marcado com peroxidase de rábano (HRP). Este conjugado liga-se aos anticorpos específicos para *Bordetella pertussis* capturados. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado adicionando substrato Tetrametilbenzidina (TMB) que dá um produto de reacção azul. A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos IgM específicos para *Bordetella pertussis* na amostra. É adicionado ácido sulfúrico para parar a reacção. Isso produz uma cor amarela final. A absorvância é lida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas ELISA.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes fornecidos

- **Poços revestidos *Bordetella pertussis* (IgM):** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com antígeno do *Bordetella pertussis*, em bolsas de folha de alumínio com fecho.
- **Diluinte de Amostra IgM ***:** 1 frasco contendo 100 ml de tampão para diluição da amostra, pH 7.2 ± 0.2; de cor verde; pronto a usar; tampa branca.
- **Solução de Paragem:** 1 frasco contendo 15 ml. Ácido sulfúrico 0.2 mol/l pronto a usar; tampa vermelha.

- **Solução de Lavagem (conc. 20x)*:** 1 frasco contendo 50 ml de um tampão concentrado 20 vezes (pH 7.2 ± 0.2) para a lavagem dos poços; tampa branca.
 - **Conjugado anti-IgM Bordetella **:** 1 frasco contendo 20 ml de anticorpo de coelho para IgM humana marcados com peroxidase; de cor vermelho, pronto a usar; tampa preta.
 - **Solução Substrato TMB:** 1 frasco contendo 15 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), pronta a usar; tampa amarela.
 - **Controlo Positivo Bordetella IgM ***:** 1 frasco contendo 2 ml; de cor amarela; pronto a usar; tampa vermelha.
 - **Controlo Cut-off Bordetella IgM ***:** 1 frasco contendo 3 ml; de cor amarela; pronto a usar; tampa verde.
 - **Controlo Negativo Bordetella IgM ***:** 1 frasco contendo 2 ml; de cor amarela; pronto a usar; tampa azul.
- * contém 0.1 % de Bronidox L após diluição
 ** contém 0.2 % de Bronidox L
 *** contém 0.1 % de Kathon

4.2. Materiais fornecidos

- 1 Suporte de tiras
- 1 Película de cobertura
- 1 Protocolo do teste
- 1 Plano de distribuição e identificação

4.3. Materiais e Equipamento necessários

- Leitor de microplacas ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubador 37°C
- Equipamento manual ou automático para a lavagem dos poços
- Pipetas para dispensar volumes entre 10 e 1000 µl
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Água desionizada ou (recentemente) destilada
- Tubos descartáveis
- Cronómetro

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo, quando armazenados a 2...8 °C.

6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante deixar todos os reagentes, amostras e controlos estabilizar à temperatura ambiente (20...25°C) antes de iniciar o teste!

6.1. Tiras revestidas destacáveis e quebráveis

As tiras revestidas destacáveis e quebráveis prontas a usar estão revestidas com antígeno Bordetella pertussis. Armazenar a 2...8°C. *Imediatamente após a remoção de tiras, as tiras restantes devem ser fechadas na bolsa de folha de alumínio juntamente com o dessecante fornecido e armazenadas a 2...8 °C; estabilidade até a data de validade.*

6.2. Conjugado anti-IgM Bordetella pertussis

O frasco contém 20 ml de uma solução com anti-IgM-humana com peroxidase de rábano, tampão, estabilizantes, conservantes e um corante vermelho inerte. A solução está pronta a usar. Armazenar a 2...8°C. *Após a primeira abertura é estável até a data de validade quando armazenado a 2...8°C.*

6.3. Controlos

Os frascos rotulados com Controlo Positivo, Cut-off e Negativo contêm uma solução de controlo pronta a usar. Esta contém 0.1 % de Kathon e tem que ser armazenada a 2...8°C. *Após a primeira abertura é estável até a data de validade quando armazenado a 2...8°C.*

6.4. Diluente de Amostra IgM

O frasco contém 100 ml de tampão fosfato, anti-IgG humana, estabilizantes, conservantes e um corante verde inerte. É usado para a diluição do espécime do doente. A solução contém anticorpos da classe anti-IgG humana para eliminar a inibição competitiva do anticorpo da classe IgG específico para remover o factor reumatóide. Esta solução pronta a usar tem de ser armazenada a 2...8°C. *Após a primeira abertura é estável até a data de validade quando armazenado a 2...8°C.*

6.5. Solução de lavagem (conc. 20x)

O frasco contém 50 ml de um tampão concentrado, detergentes e conservantes. Diluir a solução de lavagem 1+19; e.g. 10 ml de solução de lavagem + 190 ml de água redestilada recente e estéril. O tampão diluído é estável durante 5 dias à temperatura ambiente. *Os cristais na solução desaparecem aquecendo até 37 °C em banho-maria. Após a primeira abertura o concentrado é estável até a data de validade.*

6.6. Solução Substrato TMB

O frasco contém 15 ml de um sistema de tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogénio. O reagente está pronto a usar e tem de ser armazenado a 2...8°C, ao abrigo da luz. *A solução deve ser incolor ou pode ter um tom ligeiramente azulado. Se o substrato ficar azul, pode ter ficado contaminado e deve ser rejeitado. Após a primeira abertura é estável até a data de validade quando armazenado a 2...8°C.*

6.7. Solução de Paragem

O frasco contém 15 ml de solução de ácido sulfúrico 0,2 M (R 36/38, S 26). Esta solução pronta a usar tem de ser armazenada a 2...8°C. *Após a primeira abertura é estável até a data de validade quando armazenado a 2...8°C.*

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este ensaio amostras de soro ou plasma (citrato) humanos. Se o ensaio for realizado dentro de 5 dias após colheita da amostra, o espécime deve ser mantido a 2...8°C; caso contrário devem ser alicotadas e armazenadas congeladas (-70 a -20°C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de testar. *Evitar congelar e descongelar repetidamente.*
Não é recomendada a inactivação por calor das amostras.

7.1. Diluição das amostras

Antes de testar todas as amostras devem ser diluídas 1+100 com Diluente de Amostra IgM. Dispensar 10µl de amostra e 1 ml de Diluente de Amostra IgM em tubos para obter uma diluição 1+100 e misturar meticulosamente com um vortex.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

8.1. Preparação do Teste

Por favor, ler atentamente o protocolo de teste **antes** de realizar o ensaio. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita ao protocolo do teste, conforme descrito. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para ensaios ELISA é recomendável aumentar os passos de lavagem de três para cinco e o volume da solução de lavagem de 300 µl para 350µl para evitar efeitos de lavagem. Antes de iniciar o ensaio, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e controlos deve ser cuidadosamente estabelecido na folha de resultados fornecida no kit. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

Por favor, alocar pelo menos:

1 poço (e.g. A1)	para o branco substrato,
1 poço (e.g. B1)	para o controlo negativo,
2 poços (e.g. C1+D1)	para o controlo cut-off e
1 poço (e.g. E1)	para o controlo positivo.

Cabe ao utilizador decidir pela determinação dos controlos e amostras em duplicado, se necessário.

Realizar todas as etapas do ensaio na ordem indicada e sem atrasos significativos entre as etapas.

Deve ser utilizada uma ponta limpa e descartável para dispensar cada controlo e amostra.

Ajustar a incubadora para 37 ± 1°C.

1. Dispensar 100µl dos controlos e das amostras diluídas nos poços respectivos. Deixar o poço A1 vazio para o branco substrato.
2. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incubar durante 1 hora ± 5 min a 37±1°C.**
4. Quando terminar a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço três vezes com 300µl de solução de lavagem. Evitar que os poços de reacção transbordem. O tempo de actuação da solução entre cada ciclo de lavagem deve ser >5 seg. No final, retirar cuidadosamente o fluido restante batendo as tiras sobre papel absorvente, antes da próxima etapa!
Nota: A lavagem é crítica! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e valores de absorvância falsamente elevados.
5. Dispensar 100µl de Conjugado anti-IgM Bordetella pertussis em todos os poços, excepto no poço do branco (e.g. A1). Cobrir com a película.
6. **Incubar durante 30 min à temperatura ambiente. Não expor à luz solar directa.**
7. Repetir a etapa 4.
8. Dispensar 100µl de Solução Substrato TMB em todos os poços
9. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente e no escuro.**
10. Dispensar 100µl de Solução de Paragem em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a Solução Substrato TMB.

A cor azul desenvolvida durante o período de incubação passa a amarelo.

Nota: Amostras de pacientes altamente positivas podem causar precipitados escuros do cromogéneo! Estes precipitados podem influenciar a leitura da densidade óptica. É recomendada a pré-diluição da amostra com solução fisiológica de cloreto de sódio, por exemplo, 1+1. De seguida, diluir a amostra 1+100 com tampão de diluição e multiplicar os resultados em UNT por 2.

11. Medir a absorvância do espécime a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição da solução de Paragem.

8.2. Medição

Ajustar o Leitor de Microplacas ELISA a zero usando o **branco substrato no poço A1**.

Se - devido a razões técnicas – o leitor ELISA não puder ser ajustado a zero usando o branco substrato no poço A1, subtrair o valor da absorvância do poço A1 a todos os outros valores de absorvância medidos de forma a obter resultados fiáveis!

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada controlo e amostra de doente no plano de distribuição e identificação.

É recomendada a leitura com dois comprimentos de onda usando 620 nm como comprimento de onda de referência.

Onde aplicável, calcular os **valores médios da absorvância** de todos os duplicados.

9. RESULTADOS

9.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, devem ser cumpridos os seguintes critérios:

- **Branco substrato** em A1: Valor de Absorvância < **0.100**.
- **Controlo negativo** em B1: Valor de Absorvância < **0.200 and < cut-off**
- **Controlo Cut-off** em C1 e D1: Valor de Absorvância **0.150 – 1.30**.
- **Controlo Positivo** em E1: Valor de Absorvância > **cut-off**.

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e deve ser repetido.

9.2. Cálculo dos Resultados

O cut-off é o valor médio da absorvância das determinações do controlo Cut-off.

Exemplo: Valor da absorvância do controlo Cut-off 0.45 + Valor da absorvância do controlo Cut-off 0.41 = 0.86 / 2 = 0.43

Cut-off = 0.43

9.3. Interpretação dos Resultados

As amostras são consideradas **POSITIVAS** se o valor da absorvância for mais de 10% superior ao cut-off.

Amostras com um valor de absorvância 10% acima ou abaixo do cut-off não devem ser consideradas como claramente positivas ou negativas.

→ **zona cinzenta**

É recomendável repetir o teste 2 - 4 semanas mais tarde com uma nova amostra. Se os resultados do segundo teste se situarem novamente na zona cinzenta a amostra tem de ser considerada **NEGATIVA**.

As amostras são consideradas **NEGATIVAS** se o valor da absorvância for mais de 10% inferior ao cut-off.

9.3.1. Resultados em Unidades NovaTec

$$\frac{\text{Valor da absorvância (média) do doente} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Unidades NovaTec} = \text{UNT}]$$

Exemplo: $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 \text{ UNT (Unidades NovaTec)}$

Cut-off:	10	UNT
Zona cinzenta:	9-11	UNT
Negativo:	<9	UNT
Positivo:	>11	UNT

10. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

10.1. Precisão

Inter-ensaio	n	Média (E)	Cv (%)
Soro Pos.	12	0.85	9.4
Soro Pos	12	2.25	8.2

Intra-ensaio	n	Média (E)	Cv (%)
Soro Pos.	20	0.44	8.5
Soro Pos	24	1.04	14.0

10.2. Especificidade Diagnóstica

A especificidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser negativo na ausência do analito específico. É de >95 %.

10.3. Sensibilidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser positivo na presença do analito específico. É de 84.2 %.

10.4. Interferências

Não são observadas interferências com soros hemolisados, lipémicos ou ictericos até uma concentração de hemoglobina de 10 mg/ml, de triglicéridos de 5 mg/ml e de bilirrubina de 0.2 mg/ml.

Nota: Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigados; estas não são especificações garantidas.

11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Contaminação bacteriana ou a repetição de ciclos de congelação-descongelação do espécime podem afectar os valores da absorvância. O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base num único resultado do teste. Um diagnóstico preciso deve ter em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos. Em doentes imunossuprimidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito.

12. PRECAUÇÕES E AVISOS

- Em cumprimento com o artigo 1 parágrafo 2b da directiva Europeia 98/79/EC o uso de dispositivos médicos para diagnóstico in vitro destina-se segundo o fabricante a assegurar adequabilidade, desempenhos e segurança do produto. Portanto o procedimento do teste, a informação, as precauções e avisos nas instruções para utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos doentes.
- Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
- Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos. No entanto, todos os materiais devem ainda ser considerados e manuseados como potencialmente infecciosos.
- Não trocar e juntar reagentes ou tiras de lotes de produção diferentes.
- Nenhum reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.
- Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos controlos antes de utilizar novamente.
- Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos doentes e dispensar o conjugado sem salpicar precisamente no fundo dos poços.
- O NovaLisa™ ELISA foi desenhado apenas para pessoal qualificado e que esteja familiarizado com boas práticas laboratoriais.

AVISO: Na concentração utilizada o Bronidox L tem quase nenhum risco toxicológico quando em contacto com a pele e membranas mucosas!

AVISO: O ácido sulfúrico irrita os olhos e a pele. Manter fora do alcance das crianças. Após contacto com os olhos, lavar cuidadosamente com água e consultar um médico!

12.1. Considerações de Eliminação

Resíduos de químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos está regulada por leis e normativas nacionais e regionais. Contactar as autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos as quais podem aconselhar sobre como eliminar resíduos perigosos.

13. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

Prod. No.:

BOPM0030

Bordetella pertussis IgM-ELISA (96 Determinações)






BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

Wong,K.H.,and S.K.Skelton.1989.Preparation of filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis and assay for serum antibodies to filamentous hemagglutinin and pertussis toxin for clinical and public health lab.J.Clin.Microbiol.27:2805-2810

Zackrisson,G.,I.,Krantz,T.Legergard,P.Larsson,R.Sekura,N.Sigurs,J.Taranger,and B.Trollfors.1988.Humoral antibody response to pertussis toxin in patients with clinical pertussis

Zachrisson,G.,I.,Krantz,T.Lagergard,P.Larsson,R.Sekura,NSigurs,S.Taranger,and B.Trollfors.1988.Humoral antibody response to pertussis toxin in patient with clinical pertussis measured by an enzyme-linked immunosorbent assay.Eur.J.Clin.Microbiol.7:149-154

Granstrom,M., G.Granstrom, A.Lindtors 1982. Serologic diagnosis of whooping cough by an enzyme-linked immunsorbent assay using fimbrial hemagglutinin as antigen.J.Infect.Dis.146:741-745

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote / Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE / Marca CE
REF	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastrea/ Microplaca. / Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado / Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo / Soro de controllo negativo
CONTROL +	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo / Soro de controllo positivo
CUT OFF	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off / Soro de controllo Cut-off
DIL M	Sample diluent buffer IgM/ IgM-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgM/ soluzione tampone per i campioni IgM/ solución tampón para muestras IgM / Tampão diluente para amostras IgM
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante / Solução de paragem
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB / Solução substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20 / Solução de lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Bordetella pertussis IgM-ELISA

Assay preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
Email : info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

BOPM0030engl,dt,fr,it,es,port-23022011-CR