

MASTAZYME™ BORDETELLA

Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von humanen IgG-/ IgM-/ IgA-Antikörpern gegen Bordetella pertussis in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection and quantification
of human IgG / IgM / IgA antibodies
against Bordetella pertussis in serum and plasma

Test immunoenzymatique pour la détection et la quantification des anticorps
IgG / IgM / IgA anti Bordetella pertussis dans le sérum et le plasma humain

Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



**Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only /
Usage *in vitro* uniquement**



Deutsch: Seiten 03–10



English: Pages 11–17



Français: Pages 18–25

MASTAZYME™ BORDETELLA IgG
MASTAZYME™ BORDETELLA IgM
MASTAZYME™ BORDETELLA IgA

REF 680151
REF 680152
REF 680153

12 x 8 Tests
12 x 8 Tests
12 x 8 Tests

Lagerung / Storage / Conservation: 2–8 °C

Sommaire	Page
1. Domaine d'utilisation	19
2. Introduction	19
3. Principe du test	19
4. Composition du coffret	20
5. Matériel nécessaire mais non fourni	21
6. Précautions d'utilisation	21
7. Conservation et stabilité	22
8. Prélèvement et transport des échantillons	22
9. Procédure ELISA	23
10. Résultats et interprétation	24
11. Performances du test	24
12. Bibliographie	25

1. Domaine d'utilisation

Le coffret MASTAZYME™ BORDETELLA a été conçu pour la détection et la quantification des anticorps IgG / IgM / IgA dirigés contre *Bordetella* dans le sérum et le plasma. Des applications supplémentaires sur d'autres prélèvements biologiques sont possibles et peuvent être fournies sur demande.

Diagnostic *in vitro* uniquement.

Tous les résultats d'analyses doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques. Le tableau clinique et les tests supplémentaires doivent également être pris en compte.

2. Introduction

La coqueluche est une maladie du système respiratoire causée par la bactérie *Bordetella pertussis*. Elle est transmise via l'air. Le coccobacille gram-négatif produit une série de molécules biologiquement actives. Les différents composés apparaissent soit pendant la pathogenèse soit pendant le processus d'immunisation contre *B. pertussis* et produisent différents effets. La toxine de *B. pertussis* (pt), l'hémagglutinine filamentaire (fha), et différents lipopolysaccharides (LPS) ont été caractérisés.

B. pertussis montre un niveau élevé de transmission (des taux d'infection supérieurs à 90 % ont été trouvés chez des membres d'une même famille non vaccinés) et provoque des maladies graves spécialement chez les très jeunes enfants. Sur 10749 patients de moins de un an entre 1980 et 1989, 69 % ont été hospitalisés, 22 % ont souffert de pneumonie, 0,9 % ont développé une encéphalopathie et 0,6 % sont morts.

Chez les enfants plus âgés et chez les adultes (incluant les personnes vaccinées), l'infection provoque une bronchite aspécifique et une inflammation du système respiratoire supérieur. Des cas asymptomatiques sont assez courants.

La réponse sérologique suivant une infection à *B. pertussis* ou l'immunisation par vaccination a été mesurée avec des tests d'agglutination, de précipitation, par la fixation du complément et avec des tests ELISA.

Les tests ELISA utilisant l'antigène *Bordetella* (contenant la toxine, la FHA et les LPS) lié à une phase solide sont sensibles, faciles à utiliser et permettent à la fois de déterminer une séropositivité sur un sérum unique et de détecter une infection récente par le dosage des IgM et des IgA.

3. Principe du test

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

3.1 Incubation des sérums

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes adsorbés sur la phase solide pour former des complexes immuns stables. Après une incubation de 60 minutes à température ambiante, les puits sont lavés avec la solution de lavage prédiluée afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

3.2 Incubation du conjugué

Le conjugué anti-IgG /-IgM /-IgA humaines marqué à la peroxydase du Raifort est ajouté dans tous les puits. Il se lie aux anticorps IgG / IgM / IgA des complexes immuns adsorbés sur la phase solide. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le conjugué en excès est éliminé par lavage de tous les puits avec la solution de lavage.

3.3 Réaction du substrat et de la solution stop

Le substrat TMB est déposé dans tous les puits et le développement de la réaction donne une coloration stable bleu. Le développement de la réaction est stoppée après 20 minutes d'incubation à température ambiante par ajout d'acide sulfurique (H₂SO₄) 0.5 M dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

3.4 Lecture et interprétation

L'intensité de coloration est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm (filtre de référence recommandé pour la lecture bichromatique: 600–690 nm). L'intensité de coloration (DO) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient.

4. Composition du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires et suffisants pour 12 x 8 = 96 déterminations. Les barrettes et les solutions doivent être stockées à 2–8 °C. La date de péremption est inscrite sur les étiquettes.

12 barrettes	Barrettes de microtitration	Barrettes sécables de 8 puits coatées avec l'antigène de Bordetella pertussis.
1 x	Cadre de microplaque	
4 x 2 mL	Calibrateurs 1–4	Sérums humains contenant des anticorps anti-Bordetella (concentrations ci-dessous) dilués dans du PBS et stabilisés avec 0.01 % de méthylisothiazolone et 0.01 % de bromonitrodioxane comme conservateurs, prêts à l'emploi.

		IgG	IgM	IgA
Cal. 1 (négatif)	Concentration (U/mL)	1	1	1
Cal. 2 (seuil)		20	10	10
Cal. 3 (positif faible)		45	25	20
Cal. 4 (positif)		150	75	50

1 x 60 mL	Diluant des sérums	Solution tampon PBS/BSA, contient < 0.1 % d'azoture de sodium comme conservateur, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Conjugué	Conjugué HRP de chèvre anti-IgG /-IgM /-IgA humaines, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Substrat TMB	3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Solution Stop	Acide sulfurique 0.5 M, prêt à l'emploi.
1 x 60 mL	Solution de lavage concentrée 10 x	Solution tampon PBS/Tween concentrée 10 x à diluer au 1:10 avant utilisation; la solution concentrée peut être chauffée à 37 °C pour éviter la formation de cristaux.
2 x	Films adhésifs	pour couvrir les barrettes de la microplaque pendant les incubations.
1 x	Sac plastique	refermable pour éviter l'humidité sur les barrettes non utilisées.

5. Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et pipettes multicanaux de 5 µL, 100 µL et 500 µL
- Lecteur de microplaques avec filtre à 450 nm (filtre de référence 600–690 nm)
- Laveur automatique de microplaques (en cas de lavage manuel: pissette)
- Tubes pour la dilution des sérums
- Cylindre de mesure
- Eau distillée ou ultra pure

6. Précautions d'utilisation

- Usage *in vitro* uniquement! Ne pas ingérer ou avaler ! les mesures de sécurité du laboratoire doivent être suivies. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
- Tous les sérums et réactifs inclus dans le coffret ont été trouvés négatifs pour l'antigène Hbs, le VIH et le VHC. Cependant, des précautions telles que le port de gants doivent être prises.
- Si des sérums ou des réactifs sont renversés, nettoyer la surface avec une solution désinfectante (ex: eau de Javel à 5 %) puis jeter dans des récipients adaptés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18–24 °C) avant de commencer le test.
- Avant de pipeter, tous les réactifs doivent être mélangés doucement en les inclinant ou en les retournant doucement. Eviter la formation de mousse par des mélanges trop vigoureux.
- Il est important de distribuer les réactifs avec des intervalles de temps constants pour que tous les puits de la microplaques soient dans les mêmes conditions.
- Veillez à ne pas contaminer les bouchons des flacons de réactifs Eviter les risques de mélange des réactifs. Le contenu des flacons est souvent sensible à l'oxydation, ils doivent donc rester ouvert le moins longtemps possible.
- Changer d'embouts de pipette entre chaque réactif ou sérum afin d'éviter les contaminations.
- Ne pas échanger les réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser le coffret au delà de la date de péremption.
- Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires ou la norme ISO 9001 tous les matériels de laboratoire utilisés doivent être vérifiés régulièrement pour l'exactitude et la précision. Ceci comprend, les micropipettes et l'instrumentation ELISA telle que le lecteur et le laveur.
- Eviter le contact de la solution stop et du substrat avec la peau, les yeux et les muqueuses car ils peuvent provoquer des irritations ou des brûlures acides. De plus, il existe un risque d'intoxication.

7. Conservation et stabilité

Conserver tous les réactifs à 2–8 °C.

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur son étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date de péremption.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 2–8 °C.

Une fois ouvert le kit doit être utilisé dans les 3 mois.

8. Prélèvement et transport des échantillons

Le sérum ou le plasma (EDTA, héparine) peuvent être utilisés pour le test. Prélever le sang aseptiquement puis séparer le sérum par centrifugation après coagulation. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés pendant 3 jours à 2–8 °C. Ils doivent être conservés à -20 °C pour des durées plus longues. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée. Les échantillons hyperlipidiques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Les échantillons de sérum doivent être prédilués au 1:101 dans le diluant des sérums (ex: 5 µL de sérum + 500 µL de diluant des sérums) avant le test.

Les échantillons ayant des concentrations supérieures au plus fort calibrateur doivent être redilués dans le diluant des sérums.

En cas d'interférences avec le facteur rhumatoïde, il est conseillé d'adsorber les échantillons avec l'adsorbant (MASTSORB™ Code: 651003). **Ne pas adsorber les calibrateurs.**

9. Procédure ELISA

9.1. Préparation des réactifs

Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18–24 °C) avant utilisation et bien les mélanger.

Solution de lavage: Dissoudre les éventuels cristaux en chauffant à 37 °C et bien mélanger.

Diluer la solution de lavage concentrée au 1:10 avec de l'eau distillée (ex: 60 mL de solution de lavage concentrée + 540 mL d'eau distillée).
Mélanger minutieusement

- Suivre strictement les instructions pour obtenir de bons résultats. Tous changements ou modifications sont sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas rester à cette température plus longtemps que nécessaire.
- Une courbe étalon doit être réalisée pour chaque test.
- Conserver les barrettes non utilisées dans leur sac plastique à 2–8 °C.

9.2. Test ELISA

Préparer la quantité suffisante de puits pour les calibrateurs, les contrôles et les échantillons.

Remarque : D'autres conditions d'incubation peuvent être utilisées. En cas de modifications dans la procédure du test (ex: incubation à 37 °C au lieu de la température ambiante) l'utilisateur doit valider les performances du test.

1. Déposer 100 µL de chaque échantillon dilué (1:101) et de chaque calibrateur prêt à l'emploi dans les puits appropriés.
2. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 60 minutes.
3. Éliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
4. Déposer 100 µL de conjugué dans chaque puits.
5. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
6. Éliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Distribuer 100 µL de substrat dans tous les puits.
8. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber pendant 20 minutes dans le noir (ex: dans un tiroir) à température ambiante.
9. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.
10. Mélanger doucement, essuyer le dessous de la microplaque et lire la densité optique à 450 nm. Calculer les résultats. Blanc contre l'air. Une lecture bichromatique utilisant un filtre de référence à 600–690 nm est recommandée.

La couleur est stable pendant au moins 60 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.

10. Résultats et interprétation

Exemple

	DO 450 nm	DO nettes	DO moyennes
Blanc	0.020		
Calibrateur 1 (négatif)	0.150 / 0.144	0.130 / 0.124	0.127
Calibrateur 2 (seuil)	0.530 / 0.570	0.510 / 0.550	0.530
Calibrateur 3 (positif faible)	1.100 / 1.132	1.080 / 1.112	1.096
Calibrateur 4 (positif)	1.500 / 1.590	1.480 / 1.570	1.525

Le tableau ci-dessus doit être considéré comme un exemple obtenu dans des conditions arbitraires de température et d'environnement. **Il ne s'agit pas des valeurs de référence à retrouver par d'autres laboratoires dans les mêmes conditions!**

10.1. Résultats qualitatifs

Les valeurs de DO nettes calculées pour les sérums des patients sont comparées avec la valeur du calibrateur seuil. Si la valeur de l'échantillon est supérieure à la valeur du seuil, le résultat est positif.

Si la valeur de l'échantillon est inférieure à celle du seuil, le résultat est négatif. Il semble raisonnable de définir une zone de $\pm 20\%$ autour de la valeur du seuil comme zone grise. Il est recommandé de répéter les tests pour les échantillons dont la valeur se situe dans cette zone grise en utilisant le même sérum ou avec un nouvel échantillon prélevé 2 à 4 semaines après. Les deux échantillons peuvent être testés en parallèle dans la même série.

La valeur du calibrateur positif doit être au moins du double de celle du seuil.

10.2 Résultats quantitatifs

Les calibrateurs prêts à l'emploi du coffret MASTAZYME™ BORDETELLA ont des valeurs exprimées en unités arbitraires (U/mL). Ceci donne accès à une quantification exacte et reproductible permettant de suivre l'évolution du titre en anticorps. Les concentrations des calibrateurs sont imprimées sur les étiquettes des flacons.

Tracer la courbe étalon en portant les concentrations des calibrateurs sur l'axe des abscisses et la valeur moyenne d'absorbance correspondante sur l'axe des ordonnées. La concentration en anticorps du sérum du patient peut être lue directement sur la courbe.

Le calcul des résultats peut être fait en utilisant un ordinateur et le logiciel correspondant.

11. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME™ BORDETELLA IgG / IgM / IgA ELISA ont été établies et évaluées en accord avec la directive Européenne de Diagnostic In Vitro. Les données de la validation peuvent être obtenue sur demande spéciale.

12. Bibliographie

1. Chodorowska, M et al.: ELISA test used for serologic diagnosis of Pertussis; Med. Dosw. Microbiol. 48, 15 (1996).
2. Finger, H et al.: Serological diagnosis of whooping cough; Dev. Biol. Stand. 610, 331 (1985).
3. Granström, G et al.: Specific Immunoglobulin A to bordetella pertussis antigen; J. Clin. Microbiol. 26, 869 (1988).
4. Kuno-Sakai, H et al.: A simple and sensitive ELISA of antibodies to Pertussis antigens; Vaccine 10, 350 (1992).
5. Nagel, J et al.: Improved serodiagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis; Dev. Biol. Stand. 610, 325 (1985).
6. Reizenstein, E et al.: Comparison of five calculation modes for antibody ELISA against Pertussis; J. Immunol. Methods 183, 279 (1995).
7. Sato Y et al.: An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis; Dev. Biol. Stand. 73, 167 (1991).
8. Steketee, RW et al.: A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis; J. Infect. Dis. 157, 441 (1988).

Hersteller / Manufactured by:
Fabriqu  par:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriumspr parate GmbH
Feldstra e 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
www.mastgrp.com
mast@mast-diagnostica.de

Distributed by:

MAST GROUP Ltd.
MAST House, Derby Road, Bootle
UK-Mersey Side L20 1EA
Great Britain
Phone: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
www.mastgrp.com
sales@mastgrp.com

Distrib   par:

MAST DIAGNOSTIC
115, Rue Jules Barni
80000 Amiens
France
T l.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
www.mastgrp.com
service-commercial@mast-diagnostic.fr