

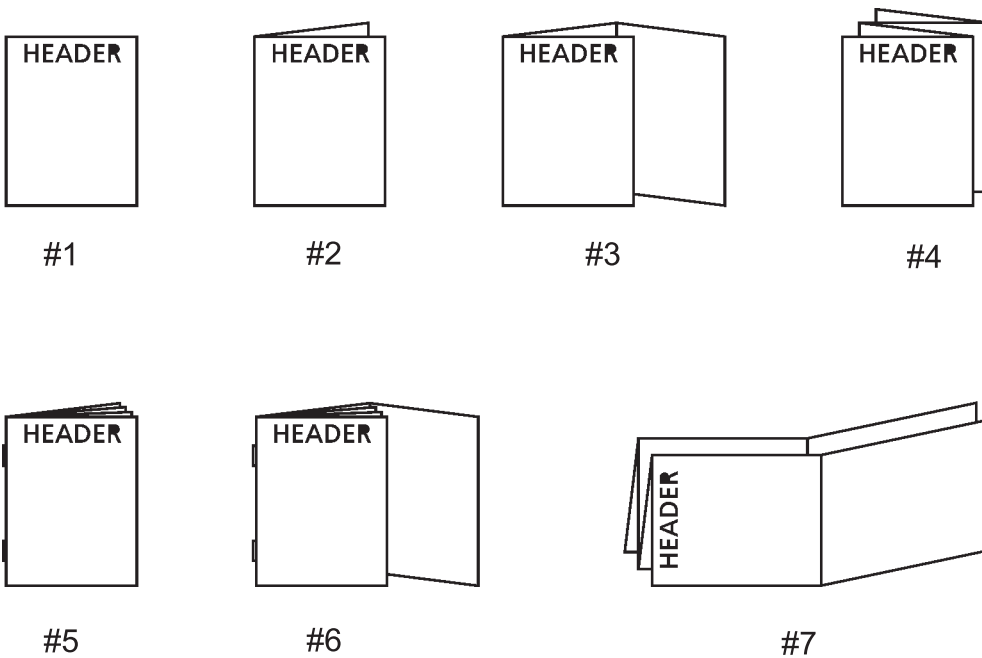
Revisions

SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
2010/11	2011/11	5950-11

Notes:

1. BD Cat. Number: 223591, 223781
2. Blank (Sheet) Size: Length: 9" Width: 36"
 Number of Pages: 18 Number of Sheets: 1
 Page Size: Length: 9" Width: 4" Final Folded Size: 2.25" x 4"
3. Style (see illustrations below): # 4



4. See Specification Control Number N/A for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: 1 PMS # 2755 BLue
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION.	BD Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: 8085878		Category and Description Package Insert, FA Bordetella Pertussis and Parapertussis	Sheet: 1 of 19 <hr/> Scale: N/A	A

BD Difco™ FA Bordetella Pertussis **Difco™ FA Bordetella Parapertussis**

English: pages 1 – 3
Français : pages 4 – 6
Deutsch: Seiten 7 – 9

Italiano: pagine 10 – 12
Español: páginas 13 – 15



8085878(01)
2011/11

Pokyny vám poskytnú miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instruccie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свяжитесь с местным представителем на BD за инструкциями. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / Өзіңіздің жергілікті BD өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

INTENDED USE

Difco™ FA Bordetella Pertussis and Difco FA Bordetella Parapertussis are recommended for use in the direct fluorescent antibody technique for the identification of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*.

SUMMARY AND EXPLANATION

All members of the genus *Bordetella* are respiratory pathogens of warm-blooded animals. *B. pertussis* and *B. parapertussis* are two species of *Bordetella* that are uniquely human pathogens. These organisms adhere to, multiply among and remain localized in the ciliated epithelial cells of the respiratory tract. *B. pertussis* is the major cause of whooping cough or pertussis. *Bordetella parapertussis* is associated with a milder, less frequently occurring form of the disease.¹ Person to person transmission occurs by the aerosol route.

Pertussis is a highly contagious disease that attacks more than 90% in unimmunized populations.² Toxin production remains the major distinction of *B. pertussis*. Classic pertussis caused by *B. pertussis* occurs in three stages. The first stage or catarrhal stage is characterized by nonspecific symptoms similar to a cold or viral infection. The disease is highly communicable during this stage, and lasts 1 – 2 weeks. In the second stage or paroxysmal stage, the cough increases in intensity and frequency. This stage is marked by sudden attacks of severe, repetitive coughing, often cumulating with the characteristic whoop.³ The whooping sound is caused by the rapid inspiration of air after the clearance of mucus-blocked airways. This stage may last 1 – 4 weeks. The beginning of the convalescent stage is marked by a reduction in frequency and severity of coughing spells. Complete recovery may require weeks or months.

Despite the availability of an effective whole-cell vaccine, pertussis remains a disease of worldwide distribution because many developing nations do not have the resources for vaccinating their populations.⁴ Even in developed nations such as Great Britain and Sweden, major outbreaks have occurred. Pertussis is endemic in the United States, with most disease occurring as isolated cases. A shift in the age group affected by the disease has occurred. In the past, children in the 1 – 5 year age group were more prone to pertussis. Children less than one year of age² have become more susceptible to the disease, because of a decrease in passively transferred maternal antibodies, since adults do not receive booster vaccinations.

Bordetella spp. are tiny gram-negative coccobacilli occurring singly or in pairs and may exhibit a bipolar appearance. They are strict aerobes and some members of the genus are motile. *B. pertussis* and *B. parapertussis* are nonmotile, and produce no acid from carbohydrates. *B. pertussis* will not grow on common blood agar bases or chocolate agar, whereas *B. parapertussis* will grow on blood agar and sometimes chocolate agar. Media for primary isolation consist of potato infusion-based media such as Bordet-Gengou (BG) medium or charcoal-based

media such as Regan-Lowe (RL) medium supplemented with glycerol, peptones and horse or sheep blood.⁵ An antibiotic agent is often added to reduce the growth of normal flora. *B. pertussis* may be recovered from secretions collected from the posterior nasopharynx, bronchoalveolar lavage and transbronchial specimens.

The direct fluorescent antibody test (DFA) has been used for many years with various degrees of success for the rapid, direct detection of *B. pertussis* and *B. parapertussis* in nasopharyngeal specimens.⁵⁻⁷ Eldering, Eveland and Kendrick^{8,9} and Holwerda and Eldering¹⁰ showed the usefulness of the FA procedure, although complete correlation between the agglutination method and FA technique was not obtained. Nonetheless, the FA procedure could detect both smooth and rough cultures of *B. pertussis* and *B. parapertussis* and could also be applied to direct specimens. Further data obtained showed little or no cross reactions between conjugates prepared from *B. pertussis* and *B. parapertussis* cultures. The disadvantage of this procedure is that technical skill and experience of the technicians is required to perform and read the test. The DFA should always be used with and not as a replacement for culture.¹¹ It has been suggested that laboratories proficient in DFA and culture for pertussis should obtain a DFA sensitivity of 60% or better and a specificity of at least 90% over time compared with culture.¹¹

B. pertussis and *B. parapertussis* are slow growing organisms, developing in 3 – 4 days. By employing the fluorescent antibody technique, the time required to detect these organisms can be significantly reduced. The FA procedure may be applied to direct nasopharyngeal smears or may be used to identify young cultures of *B. pertussis* or *B. parapertussis*.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The FA technique involves the preparation of a smear from the clinical specimen or culture isolate on a glass slide. Nasopharyngeal swabs are obtained from the patient and inoculated into 0.5 mL of Casamino Acids solution.¹¹ Smears are made from this solution and stained with a specific antibody labeled with a fluorescent marker (fluorescein isothiocyanate or FITC) directed against *B. pertussis* or *B. parapertussis*. After incubation with the antibody preparation, smears are washed in a phosphate-buffered saline, air dried, cover slipped with fluorescent-antibody mounting fluid, and examined under a fluorescent microscope.

REAGENTS

Difco FA Bordetella Pertussis and Difco FA Bordetella Parapertussis are lyophilized, polyclonal, fluorescein-conjugated, chicken antisera. They have been prepared with modifications according to the method of Eldering, Eveland and Kendrick^{8,9} and Holwerda and Eldering.¹⁰ Approximately 0.1% sodium azide is added as a preservative.

Difco FA Buffer, Dried is a phosphate buffer-NaCl mixture, which, upon rehydration, yields a 0.85% saline solution buffered to pH 7.2.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 is standardized reagent grade glycerin adjusted to pH 7.2.

Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

The Packaging of This Product Contains Dry Natural Rubber.

Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures.^{12,13} After use, specimens, containers, slides, tubes and other contaminated material must be sterilized by autoclaving. Directions for use should be followed carefully.

WARNING: This product contains sodium azide. Sodium azide is toxic by inhalation, by skin contact, and if swallowed. Contact with acid liberates very toxic gas. After contact with skin, wash immediately with plenty of water. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.

Storage: Store lyophilized **Difco** FA Bordetella Pertussis and **Difco** FA Bordetella Parapertussis at 2 – 8°C. Aliquots of the titered conjugate may be put into small vials, frozen in the undiluted state and stored below -20°C for optimal stability. The conjugate should not be exposed to repeated freezing and thawing.

Store dehydrated FA Buffer, Dried below 30°C. Store rehydrated FA Buffer, Dried at 2 – 8°C.

Store FA Mounting Fluid pH 7.2 at 15 – 30°C.

Prolonged exposure of reagents to temperatures other than those specified is detrimental to the products.

Product Deterioration: Expiration date applies to product in its intact container when stored as directed. Do not use if the product is caked, discolored or shows other signs of deterioration.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Direct Nasopharyngeal Smears

1. Obtain a nasopharyngeal swab and emulsify in 0.5 mL of sterile 1% **Bacto**™ Casamino Acids.¹¹
2. Hold specimen in Casamino Acids solution for no more than 2 h.
3. Smear emulsified specimen on a clean microscope slide.
4. Allow smear to air dry and fix by gentle heating or by 1 min immersion in 95% ethanol.

Culture Isolates

1. From clinical specimens, isolation of *Bordetella* requires the use of certain media such as Bordet-Gengou Agar or Regan-Lowe Agar. Colonies of *B. pertussis* on Bordet-Gengou Agar are very small, white, opaque, convex and entire. Colonies on Regan-Lowe Agar are round, domed, mercury-silver colored and shiny. For specific recommendations, consult appropriate references.^{3,11} Determine that a pure culture of the microorganism has been obtained and that biochemical test reactions are consistent with the identification of the organism as *Bordetella* sp. After these criteria are met, serological identification can be performed.
2. Pick appropriate colonies and emulsify in approximately 2 mL sterile purified water. Adjust cell density to approximate a McFarland Turbidity Standard No.1.
3. Smear emulsified specimen on a clean microscope slide.
4. Allow smear to air dry and fix by 1 min immersion in 95% ethanol. Remove slides and allow them to air dry.

PROCEDURE

Materials Provided: **Difco** FA Bordetella Pertussis, **Difco** FA Bordetella Parapertussis, **Difco** FA Buffer, Dried, **Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2, 1% **Bacto** Casamino Acids

Materials Required But Not Provided: Fluorescent microscope assembly:

Lamps: HBO-50, HBO-100, HBO-200 or Xenon XBO-150; 6X 5A Tungsten. Excitation wavelength: 365 nm. Ocular: 10X. Objective: 10X, 40X (Fluorite). Filters: BG-12 or KP490,

K515 or K530. Condenser: Dark field D1.20-1.40.

Microscope slides, 95% ethanol, Staining jar, Cover slips, McFarland Turbidity Standard No. 1, Staining tray or moisture chamber.

Reagent Preparation: Equilibrate all materials to room temperature prior to performing the tests. Ensure that all glassware and pipettes are clean and free of residues such as detergents.

To rehydrate **Difco** FA Bordetella Pertussis and **Difco** FA Bordetella Parapertussis, add 5 mL sterile purified water and rotate gently to completely dissolve the contents.

The working dilution of the conjugate should be determined shortly after its rehydration. The titer of a conjugate varies with the technique used, the fluorescent microscope used, the filter used and the age of the bulb.

The conjugate should be titrated using a known culture of *B. pertussis* or *B. parapertussis* homologous to the conjugate. Dilutions of the conjugate are made in rehydrated **Difco** FA Buffer. (Prepare FA Buffer, Dried by dissolving one vial or 10 g in 1 L purified water.) The titer is determined as follows:

Dilution of conjugate	Fluorescence
1:5	4+
1:10	4+
1:20	4+
1:40	4+
1:80	2+

In this example, the last 4+ fluorescence is found in a 1:40 dilution of the conjugate. One less dilution is chosen for a margin of safety. Therefore, the working dilution, in this case is 1:20.

To rehydrate FA Buffer, Dried, add 10 g to 1 L of purified water and stir until completely dissolved.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 is ready for use.

Control Slides: Prepare positive and negative control slides using appropriate homologous and heterologous antigens (i.e., cultures), following the procedure listed under "Specimen Collection and Preparation, Culture Isolates."

Test Procedure

1. Add several drops (one drop equals ~35 μ L) of the appropriate **Difco** FA Bordetella conjugate to the fixed smear.
2. Spread the conjugate over the surface of the smear.
3. Place the slides in a staining tray or moisture chamber.
4. Incubate at room temperature for 30 min.
5. Remove the excess conjugate and place the slide in a staining jar containing **Difco** FA Buffer for 10 min with 2 changes of the buffer followed by 1 rinse in purified water for 2 min.
6. Remove the slide and allow to drain and air dry, or blot with bibulous paper.
7. Add a drop (~35 μ L) of **Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2 to the center of the stained area and mount with a cover slip.
8. Examine each smear using a fluorescent microscope with an excitation wavelength of 365 nm under a 40X or 100X objective. Record presence or absence and degree of fluorescence.

User Quality Control

At the time of use, test both positive and negative antigen controls to check performance of the antisera, techniques and methodology.

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent CLSI guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

RESULTS

1. Read and record results based on intensity of fluorescence as follows:
 - 4+ Maximum fluorescence; brilliant yellow-green peripheral staining
 - 3+ Bright yellow-green peripheral staining

- 2+ Definite, but dull, yellow-green peripheral staining
 - 1+ Barely visible peripheral staining
 - Complete absence of yellow-green peripheral fluorescence
2. The positive control should show a 4+ reaction with the homologous conjugate.
 3. The negative control should not exceed a 1+ reaction with the heterologous conjugate.
 4. For the test smears, a 2+ fluorescence should be considered a positive result.
 5. If the positive control is less than 3+, or the negative control exceeds 1+, the conjugate may have deteriorated or pH may have changed in the FA Buffer or FA Mounting Fluid. Repeat test with new reagents.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. When testing culture isolates, growth from antibiotic-free media should be used to avoid autoagglutination.¹¹
2. Some experience is required to grade the intensity of the fluorescence and to ignore the occasional nonspecific staining of gram-negative diplococci, gram-positive cocci, and diphtheroid-like rods.¹¹
3. When testing culture isolates, the density of the positive control should be adjusted to give 4+ fluorescence with homologous conjugate. The density of culture isolates should be comparable to the positive control in order to standardize the fluorescence.
4. All glassware employed in the preparation, testing and storage of these reagents must be free of detergents or other harmful residues.
5. The fluorescent antibody technique can provide only presumptive identification of *B. pertussis* or *B. parapertussis*. A negative result should not be considered conclusive, as this type of reaction may occur when only a few organisms are present in the specimen. Final identification can only be made after consideration of biochemical, morphological and serological characteristics.
6. Cross reactions of variable staining intensities may occur with a small population of the cells in a *B. bronchiseptica* suspension at any dilution of the conjugate.
7. For both **Difco** FA Bordetella Pertussis and **Difco** FA Bordetella Parapertussis, the reaction should be brilliant and specific with smooth strains of homologous cultures. With some heterologous strains a 1+ reaction may occur. Such minimal reactions should not interfere with the interpretation of the test results.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS¹⁴

The performance of **Difco** FA Bordetella Pertussis (DFA), manufactured by Difco Laboratories, a subsidiary of Becton, Dickinson and Company, was compared to culture and an in-house developed PCR assay in a study by Loeffelholz, Thompson, Long and Gilchrist.¹⁴ Three hundred nineteen (319) paired nasopharyngeal swab specimens were tested for the presence of *B. pertussis* in this study. The results of this study are summarized in the table below:

Method	Sensitivity*	Specificity
Culture	15.2%	100%
DFA	52.2%	98.2%
PCR	93.5%	97.1%

*Based on 46 positive specimens that were either (i) culture positive, (ii) PCR and DFA positive, or (iii) PCR or DFA positive, with clinical features indicating pertussis.

AVAILABILITY

Cat. No. Description

- 223591 **Difco**™ FA Bordetella Pertussis, 5 mL
- 223781 **Difco**™ FA Bordetella Parapertussis, 5 mL
- 223143 **Difco**™ FA Buffer, Dried, 6 x 10 mL
- 223142 **Difco**™ FA Buffer, Dried, 100 g
- 223050 **Bacto**™ Casamino Acids, 500 g

REFERENCES

1. Linneman, C.C. and E.B. Pery. 1977. *Bordetella parapertussis*: recent experience and a review of the literature. *Am. J. Dis. Child.* 131:560-563.
2. Bass, J.W. and S.R. Stephenson. 1987. The return of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:141-144.
3. Loeffelholz, M.J. 2003. *Bordetella*, p. 780-788. In Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover, Manual of clinical microbiology, 8th ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Wright, P.F. 1991. Pertussis in developing countries: definition of the problem and prospects for control. *Rev. Infect. Dis.* 13: S228-S234.
5. Strelbel, P.M., S.L. Cochi, K.M. Farizo, B.J. Payne, S.D. Hanauer and A.L. Baughman. 1993. Pertussis in Missouri: evaluation of nasopharyngeal culture, direct fluorescent antibody testing, and clinical case definitions in the diagnosis of pertussis. *Clin. Infect. Dis.* 16:276-285.
6. Halperin, S.A., R. Bortolussi and A.J. Wort. 1989. Evaluation of culture, immunofluorescence and serology for the diagnosis of pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 27:752-757.
7. Onorato, I.M. and S.G.F. Wassilak. 1987. Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:145-151.
8. Kendrick, P.L., G. Eldering and W.C. Eveland. 1961. Fluorescent antibody techniques. *Am. J. Diseases Children.* 101:149-154.
9. Eldering, G., W.C. Eveland and P.L. Kendrick. 1962. Fluorescent antibody staining and agglutination reactions in *Bordetella pertussis* cultures. *J. Bacteriol.* 83:745-749.
10. Holwerda, J. and G. Eldering. 1963. Culture and fluorescent antibody methods in diagnosis of whooping cough. *J. Bacteriol.* 86:449-451.
11. Pezzlo, M. 1994. Aerobic bacteriology, p. 1.0.1-1.20.47. In Isenberg, H.D. (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC) 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
14. Loeffelholz, M.J., C.J. Thompson, K.S. Long and M.J.R. Gilchrist. 1999. Comparison of PCR, culture and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J. Clin. Microbiol.* 37:2872.



BD Difco FA Bordetella Pertussis

BD Difco FA Bordetella Parapertussis

Français

APPLICATION

Le **Difco FA Bordetella Pertussis** et le **Difco FA Bordetella Parapertussis** sont recommandés pour réaliser les tests d'immunofluorescence directe utilisés pour l'identification de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis*.

RESUME ET EXPLICATION

Tous les microorganismes du genre *Bordetella* sont des agents pathogènes respiratoires chez les animaux à sang chaud. *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont des agents pathogènes connus uniquement chez l'homme. Ces microorganismes adhèrent aux cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires, s'y multiplient et y demeurent. *B. pertussis* est l'agent pathogène principal de la coqueluche. *Bordetella parapertussis* est associé à une forme bénigne moins fréquente de la maladie.¹ La transmission entre individus s'effectue par aérosol.

La coqueluche est une maladie extrêmement contagieuse touchant plus de 90 % des populations non vaccinées.² La production de toxines demeure la principale caractéristique de *B. pertussis*. La coqueluche classique, causée par *B. pertussis*, évolue en trois stades distincts. Le premier stade, appelé stade catarrhal, se caractérise par des symptômes non spécifiques similaires à ceux d'un rhume ou d'une infection virale. La maladie est extrêmement contagieuse à ce stade, qui dure une à deux semaines. Lors du deuxième stade, dit paroxystique, l'intensité et la fréquence de la toux augmentent. Les quintes de toux spasmodiques, caractéristiques de ce stade, sont soudaines, sévères et répétitives.³ Le « chant du coq » est provoqué par une reprise respiratoire rapide après l'expectoration du mucus encombrant les voies respiratoires. La durée de ce stade est d'une à quatre semaines. Le début de la phase de convalescence est marqué par une réduction de la fréquence et de la sévérité des quintes. La guérison complète nécessite parfois plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

Bien qu'un vaccin à cellules entières efficace soit disponible, la coqueluche demeure une pandémie mondiale, de nombreux pays en développement n'ayant pas les ressources nécessaires pour faire vacciner leur population.⁴ Même les pays développés, comme la Grande-Bretagne et la Suède, ont connu plusieurs épidémies majeures. La coqueluche est endémique aux Etats-Unis, avec la plupart du temps des cas isolés. On a observé un changement de la tranche d'âge concernée. Par le passé, la maladie touchait les enfants âgés de 1 à 5 ans. Au fil des années, les enfants de moins d'un an² sont devenus plus sensibles à la maladie en raison d'une diminution des anticorps maternels transmis passivement, dans la mesure où les adultes ne reçoivent pas de vaccins de rappel.

Les *Bordetella* spp. sont de minuscules coccobacilles à Gram négatif, seuls ou appariés, et présentent éventuellement un aspect bipolaire. Ce sont des aérobies stricts. Certains microorganismes appartenant à ce genre sont motiles, mais *B. pertussis* et *B. parapertussis* ne le sont pas et ne produisent pas d'acide à partir des hydrates de carbone. *B. pertussis* ne se développe pas sur les milieux habituels à base de gélose au sang ou de gélose au chocolat, alors que *B. parapertussis* se développe sur gélose au sang, voire sur gélose au chocolat. Les milieux d'isolement primaires comprennent des milieux à base d'infusion de pommes de terre, comme le milieu de Bordet-Gengou (BG), ou des milieux à base de charbon, comme le milieu de Regan-Lowe (RL) complétement en glycérol, peptones et sang de cheval ou de mouton.³ On ajoute souvent un agent antibiotique pour limiter la croissance de la flore normale. *B. pertussis* peut être isolé à partir des sécrétions recueillies par lavages broncho-alvéolaires et d'échantillons trans-bronchiques ou prélevés au niveau du rhinopharynx postérieur.

Le test d'immunofluorescence directe est utilisé depuis de nombreuses années avec des résultats différents pour la

détection directe rapide de *B. pertussis* et *B. parapertussis* dans des échantillons d'origine rhinopharyngée.⁵⁻⁷ Eldering, Eveland et Kendrick^{8,9} et Holwerda et Eldering¹⁰ ont montré l'utilité de la méthode d'immunofluorescence, bien qu'une corrélation complète entre les méthodes d'agglutination et d'immunofluorescence n'ait pas été atteinte. Toutefois, la méthode d'immunofluorescence a permis de détecter les cultures lisses et rugueuses de *B. pertussis* et *B. parapertussis* et a pu être appliquée aux échantillons directs. Des données supplémentaires ont montré peu de réactions croisées, voire aucune, entre les conjugués préparés à partir de cultures de *B. pertussis* et *B. parapertussis*. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite des techniciens formés et expérimentés pour effectuer le test et interpréter les résultats. La méthode d'immunofluorescence doit être envisagée comme un test complémentaire à la culture et non s'y substituer.¹¹ Il a été suggéré que les laboratoires capables d'effectuer ce test obtiennent une sensibilité à l'immunofluorescence de 60 % minimum et une spécificité d'au moins 90 % dans le temps par comparaison avec la culture.¹¹

B. pertussis et *B. parapertussis* sont des microorganismes à croissance lente, qui se développent en 3 à 4 jours. Avec la méthode d'immunofluorescence, le temps nécessaire à la détection de ces microorganismes est sensiblement réduit. Cette méthode peut être appliquée à des frottis rhinopharyngiens directs et servir à l'identification de jeunes cultures de *B. pertussis* et *B. parapertussis*.

PRINCIPES DE LA METHODE

La méthode d'immunofluorescence implique la préparation d'un frottis à partir du spécimen clinique ou de l'isolat de culture sur une lame de verre. Les écouvillonnages rhinopharyngiens sont effectués sur le patient et ensemencés dans 0,5 mL de solution d'acides casaminés.¹¹ Des frottis sont réalisés à partir de cette solution et une coloration est effectuée avec un anticorps spécifique conjugué à un marqueur fluorescent (isothiocyanate de fluorescéine ou FITC) dirigé contre *B. pertussis* ou *B. parapertussis*. Après une incubation avec la préparation contenant l'anticorps, les frottis sont lavés dans du sérum physiologique tamponné au phosphate, séchés à l'air, placés sous une lamelle couvre-objet avec du liquide de montage d'anticorps fluorescent et examinés au microscope à fluorescence.

REACTIFS

Le **Difco FA Bordetella Pertussis** et le **Difco FA Bordetella Parapertussis** sont des antisérums de poulet lyophilisés, polyclonaux et conjugués à la fluorescéine. Ils ont été préparés selon une formule modifiée conformément aux méthodes de Eldering, Eveland et Kendrick^{8,9} et de Holwerda et Eldering.¹⁰ Ils contiennent environ 0,1 % d'azide de sodium (agent conservateur).

Le **Difco FA Buffer**, Dried est un mélange de tampon-phosphate et de NaCl, qui après réhydratation, produira une solution de NaCl à 0,85 % tamponnée à pH 7,2.

Le **Difco FA Mounting Fluid pH 7.2** est une glycérine standardisée de qualité réactif ajustée à pH 7,2.

Avertissements et précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

L'emballage de ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

Respecter les techniques d'asepsie et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques.^{12,13} Après utilisation, stériliser à l'autoclave les échantillons, les récipients, les lames, les tubes et les autres matériels contaminés. Respecter scrupuleusement le mode d'emploi.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient de l'azide de sodium, qui est toxique par inhalation, contact avec la peau ou ingestion. Au contact d'un acide, un gaz très toxique est dégagé. Après tout contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau. L'azide de sodium peut réagir au contact du plomb

ou du cuivre des canalisations et former des azides métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, faire couler un volume d'eau important pour éviter l'accumulation d'azides.

Conservation : Conserver les **Difco FA Bordetella Pertussis** et **Difco FA Bordetella Parapertussis** lyophilisés entre 2 et 8 °C. Il est possible d'aliqoter le conjugué titré dans de petits flacons et de conserver les aliquotes non diluées à une température inférieure à -20 °C pour assurer une stabilité optimale. Eviter de multiplier les cycles de congélation-décongélation.

Conserver le FA Buffer, Dried déshydraté à une température inférieure à 30 °C, et le FA Buffer, Dried réhydraté entre 2 et 8 °C.

Conserver le FA Mounting Fluid pH 7.2 entre 15 et 30 °C.

L'exposition prolongée des réactifs à des températures autres que les températures spécifiées a un effet adverse sur ceux-ci.

Détérioration du produit : La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions. Ne pas utiliser le produit s'il présente un aspect agglutiné ou décoloré ou d'autres signes de détérioration.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Frottis rhinopharyngiens directs

- Réaliser un écouvillonnage rhinopharyngien et le mettre en suspension dans 0,5 mL de **Bacto Casamino Acids** à 1 %.¹¹
- Laisser l'échantillon dans la solution d'acides casaminés pendant 2 h maximum.
- Etaler les échantillons émulsifiés sur une lame de microscope propre.
- Laisser le frottis sécher à l'air et le fixer en le chauffant légèrement ou en l'immergeant pendant 1 min dans de l'éthanol à 95 %.

Isolats de culture

- L'isolement de *Bordetella* à partir d'échantillons cliniques nécessite l'utilisation de certains milieux comme la gélose de Bordet-Gengou ou la gélose de Regan-Lowe. Les colonies de *B. pertussis* formées sur la gélose de Bordet-Gengou sont très petites, blanches, opaques, convexes et continues. Les colonies isolées sur la gélose de Regan-Lowe sont rondes, bombées, de couleur mercure-argent et brillantes. Des recommandations spécifiques figurent dans les documents cités en référence.^{3,11} Contrôler la pureté de la culture et s'assurer que les résultats des tests biochimiques concordent avec l'identification du microorganisme comme *Bordetella* spp. Si ces conditions sont remplies, l'identification sérologique peut être effectuée.
- Prélever les colonies appropriées et les émulsifier dans 2 mL environ d'eau purifiée stérile. Ajuster la densité cellulaire à une densité s'approchant du standard de turbidité de McFarland n° 1.
- Etaler les échantillons émulsifiés sur une lame de microscope propre.
- Laisser le frottis sécher à l'air et le fixer en l'immergeant pendant 1 min dans de l'éthanol à 95 %. Enlever les lames et les laisser sécher à l'air.

METHODE

Matériaux fournis : **Difco FA Bordetella Pertussis**, **Difco FA Bordetella Parapertussis**, **Difco FA Buffer, Dried**, **Difco FA Mounting Fluid pH 7.2** et **Bacto Casamino Acids** à 1 %

Matériaux requis mais non fournis : Microscope à fluorescence :

Lampes : HBO-50, HBO-100, HBO-200 ou XBO-150 xénon ; 6X 5A au tungstène. Longueur d'onde d'excitation : 365 nm. Oculaire : 10X. Objectif : 10X, 40X (fluorite). Filtres : BG-12 ou KP490 et K515 ou K530. Condensateur : D1.20-1.40 pour fond noir.

Lames de microscope, éthanol à 95 %, cuve à coloration, lamelles, standard de turbidité McFarland n° 1, plateau pour coloration et chambre humide.

Préparation du réactif : Laisser tous les matériels s'équilibrer à température ambiante

avant de procéder aux tests. S'assurer que la verrerie et les pipettes utilisées sont propres et exemptes de résidus, comme des traces de détergent par exemple.

Pour réhydrater les antisérums **Difco FA Bordetella Pertussis** et **Difco FA Bordetella Parapertussis**, ajouter 5 mL d'eau purifiée stérile et faire tourner doucement jusqu'à dissolution complète du contenu.

La dilution de travail du conjugué doit être déterminée dès la fin de sa réhydratation. Le titre du conjugué varie selon la méthode, le microscope à fluorescence, le filtre et l'âge de l'ampoule.

Le conjugué doit être titré à l'aide d'une culture connue de *B. pertussis* ou de *B. parapertussis* homologue au conjugué. Des dilutions du conjugué sont effectuées dans le **Difco FA Buffer réhydraté**. (Préparer le FA Buffer, Dried en dissolvant un flacon ou 10 g dans 1 L d'eau purifiée.) Le titre du conjugué est déterminé comme suit :

Dilution du conjugué	Fluorescence
1/5	4+
1/10	4+
1/20	4+
1/40	4+
1/80	2+

Dans cet exemple, la dernière fluorescence 4+ correspond à une dilution à 1/40 du conjugué. On choisit une dilution de moins comme marge de sécurité. Par conséquent, dans ce cas, la dilution de travail est 1/20.

Pour réhydrater le FA Buffer, Dried, ajouter 10 g à 1 L d'eau purifiée et mélanger jusqu'à dissolution complète.

Le **Difco FA Mounting Fluid pH 7.2** est prêt à l'emploi.

Lames de contrôle : Préparer des lames de contrôle positif et négatif à l'aide des antigènes (donc des cultures) homologue et hétérologue appropriés, conformément à la méthode indiquée au paragraphe « Prélèvement et manipulation des échantillons, Isolats de culture ».

MODE OPERATOIRE DU TEST

- Ajouter au frottis fixé plusieurs gouttes de conjugué **Difco FA Bordetella** approprié (une goutte correspond à 35 µL environ).
- Etaler le conjugué sur la surface du frottis.
- Placer les lames sur le plateau pour coloration ou dans la chambre humide.
- Incuber à température ambiante pendant 30 min.
- Eliminer le conjugué en excès et placer la lame dans une cuve à coloration contenant du **Difco FA Buffer** pendant 10 min, avec 2 changements de tampon suivis d'un rinçage dans de l'eau purifiée pendant 2 min.
- Sortir la lame, l'égoutter et la laisser sécher à l'air ou la sécher sur du papier absorbant.
- Ajouter une goutte (35 µL environ) de **Difco FA Mounting Fluid pH 7.2** au centre de la zone marquée et placer une lamelle sur la lame.
- Examiner chaque frottis au microscope fluorescent avec une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et un objectif de 40X ou 100X. Rapporter la présence, l'absence et le degré de fluorescence.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Tester dans la même série des antigènes de contrôle positifs et négatifs pour contrôler les performances des antisérums, des techniques et de la méthodologie.

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

RESULTATS

- Mesurer et enregistrer les résultats basés sur l'intensité de la fluorescence comme suit :
4+ Fluorescence maximale ; coloration périphérique brillante jaune-vert

- 3+ Coloration périphérique brillante jaune-vert
 - 2+ Coloration périphérique nette, mais terne, jaune-vert
 - 1+ Coloration périphérique à peine visible
 - Absence complète de fluorescence périphérique jaune-vert
2. Le contrôle positif doit montrer une réaction de 4+ avec le conjugué homologue.
 3. Le contrôle négatif ne doit pas dépasser une réaction de 1+ avec le conjugué hétérologue.
 4. Pour les frottis test, une fluorescence de 2+ doit être considérée comme un résultat positif.
 5. Si le contrôle positif est inférieur à 3+ ou si le contrôle négatif dépasse 1+, le conjugué s'est détérioré ou le pH du FA Buffer ou du FA Mounting Fluid a changé. Recommencer le test en utilisant de nouveaux réactifs.

LIMITES DE LA PROCEDURE

1. Lors du test d'isolats de culture, il faut utiliser des colonies prélevées sur des milieux ne contenant pas d'antibiotiques pour éviter une autoagglutination.¹¹
2. Il faut une certaine expérience pour mesurer l'intensité de la fluorescence et ignorer la coloration non spécifique éventuelle de diplocoques à Gram négatif, de cocci à Gram positif et de bâtonnets diphtéroïdes.¹¹
3. Lors des tests d'isolats de culture, la densité du contrôle positif doit être ajustée pour donner une fluorescence de 4+ avec le conjugué homologue. La densité des isolats de culture doit être comparable au contrôle positif afin de standardiser la fluorescence.
4. Toute la verrerie utilisée lors de la préparation, des tests et de la conservation de ces réactifs doit être exempte de détergent ou d'autres résidus délétères.
5. La méthode d'immunofluorescence ne permet d'obtenir qu'une identification présomptive de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*. Un résultat négatif ne doit pas être considéré comme suffisant dans la mesure où ce type de réaction peut se produire même si l'échantillon ne contient que quelques microorganismes. L'identification finale nécessite des tests biochimiques, morphologiques et sérologiques.
6. Des réactions croisées d'intensité de coloration variable sont susceptibles de se produire avec quelques cellules dans une suspension de *B. bronchiseptica*, quelle que soit la dilution du conjugué.
7. Pour **Difco** FA Bordetella Pertussis comme pour **Difco** FA Bordetella Parapertussis, la réaction doit être brillante et spécifique, avec des souches lisses de cultures homologues. Une réaction 1+ est susceptible de se produire avec certaines souches hétérologues. De telles réactions minimales ne doivent pas interférer avec l'interprétation des résultats.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES¹⁴

Les performances du **Difco** FA Bordetella Pertussis (DFA), fabriqué par Difco Laboratories, filiale de Becton, Dickinson and Company, ont été comparées à celles d'une culture et d'un test par PCR développé en interne dans une étude menée par Loeffelholz, Thompson, Long et Gilchrist.¹⁴ Dans le cadre de cette étude, 319 écouvillonnages rhinopharyngés appariés ont été testés pour déceler la présence éventuelle de *B. pertussis*. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Méthode	Sensibilité*	Spécificité
Culture	15,2 %	100 %
DFA	52,2 %	98,2 %
PCR	93,5 %	97,1 %

*Basée sur 46 échantillons positifs qui étaient (i) positifs en culture, (ii) positifs par PCR et au DFA ou (iii) positifs par PCR et au DFA avec le tableau clinique de la coqueluche.

CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
223591	Difco FA Bordetella Pertussis, 5 mL
223781	Difco FA Bordetella Parapertussis, 5 mL
223143	Difco FA Buffer, Dried, 6 x 10 mL
223142	Difco FA Buffer, Dried, 100 g
223050	Bacto Casamino Acids, 500 g

REFERENCES : voir la rubrique « References » du texte anglais.



BD Difco FA Bordetella Pertussis

Difco FA Bordetella Parapertussis

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Difco FA Bordetella Pertussis und **Difco FA Bordetella Parapertussis** werden für die Direkt-Fluoreszenz-Antikörper-Technik zur Identifizierung von *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis* empfohlen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Alle Angehörigen des Genus *Bordetella* sind Atemwegspathogene warmblütiger Lebewesen. *B. pertussis* und *B. parapertussis* sind zwei nur für den Menschen pathogene *Bordetella*-Spezies. Diese Organismen setzen sich an den Flimmerepithelzellen der Atemwege fest, vermehren sich zwischen diesen und verbleiben dort. *B. pertussis* ist der Haupterreger von Keuchhusten (Pertussis). *Bordetella parapertussis* ist mit einer mildereren, weniger häufig auftretenden Form der Krankheit assoziiert.¹ Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt per Tröpfcheninfektion.

Keuchhusten ist eine äußerst ansteckende Krankheit, die bei Populationen ohne Impfschutz mehr als 90 % der Individuen befällt.² Die Toxinproduktion ist nach wie vor das Hauptmerkmal von *B. pertussis*. Klassischer, durch *B. pertussis* hervorgerufener Keuchhusten verläuft in drei Stadien. Das 1. Stadium (Stadium catarrhale, auch: Katarrhstadium) zeichnet sich durch unspezifische Symptome aus, die denen einer Erkältung oder Virusinfektion ähneln. In diesem 1 – 2 Wochen anhaltenden Stadium ist die Krankheit äußerst ansteckend. Im 2. Stadium (Stadium convulsivum, auch: Paroxysmalstadium) nimmt die Heftigkeit und Häufigkeit der Hustenanfälle zu. Bezeichnend für dieses Stadium sind plötzliche starke und wiederholte Hustenanfälle, die oft mit charakteristischem „Juchzen“ oder „Keuchen“ kumulieren.³ Dieses Keuchen ergibt sich aus dem raschen Einziehen von Luft nach dem Durchgängigwerden verschleimter Atemwege. Dieses Stadium kann 1 – 4 Wochen lang andauern. Der Beginn des 3. Stadiums (Stadium decrementi, auch: Genesungsstadium) zeichnet sich durch das Nachlassen von Häufigkeit und Heftigkeit der Hustenanfälle ab. Die vollständige Rekonvaleszenz kann Wochen oder Monate dauern.

Trotz der Verfügbarkeit eines wirksamen Ganzzell-Impfstoffes ist Keuchhusten weiterhin eine weltweit verbreitete Erkrankung, da vielen Entwicklungsländern die Mittel für die Impfung ihrer Bevölkerung fehlen.⁴ Selbst in entwickelten Ländern, wie Großbritannien und Schweden, kam es zu größeren Krankheitsausbrüchen. In den Vereinigten Staaten ist Keuchhusten endemisch, und die meisten Krankheitsfälle treten isoliert auf. Die von Keuchhusten betroffene Altersgruppe hat sich geändert. Früher waren Kinder in der Altersgruppe von 1 – 5 Jahren für Keuchhusten anfälliger. Auf Grund eines reduzierten passiven Transfers mütterlicher Antikörper (da Erwachsene keine Auffrischimpfungen erhalten) sind nunmehr Kinder im Alter von weniger als einem Jahr² anfälliger für die Erkrankung.

Bordetella spp. sind einzeln oder paarweise auftretende, winzige, gramnegative Kokkenbazillen mit u.U. bipolarer Form. Sie sind strikt aerob, und einige Angehörige des Genus sind bewegungsfähig. *B. pertussis* und *B. parapertussis* sind bewegungsunfähig und produzieren keine Säure aus Kohlenhydraten. *B. pertussis* wächst nicht auf gewöhnlichen Blutagarbasen und auch nicht auf Schokoladenagar, während *B. parapertussis* auf Blutagar und mitunter auch auf Schokoladenagar wächst. Medien für die Erstisolierung umfassen Medien auf Kartoffelinfusionsbasis, wie bspw. Bordet-Gengou-Medium (BG), oder Medien auf Aktivkohlebasis, wie bspw. Regan-Lowe-Medium (RL), mit Glycerin-, Pepton- und Pferdeblut- oder Schafblut-Zusatz.³ Häufig wird ein Antibiotikum zugesetzt, um das Wachstum der normalen Flora zu reduzieren. *B. pertussis* kann aus Sekreten des hinteren Nasenrachenraums, Bronchoalveolär-Lavagen und transbronchialen Proben gewonnen werden.

Der Direkt-Fluoreszenz-Antikörper-Test (DFA) wird seit vielen Jahren mehr oder weniger erfolgreich zum raschen direkten Nachweis von *B. pertussis* und *B. parapertussis* in Nasenrachenraum-Proben eingesetzt.⁵⁻⁷ Eldering, Eveland und Kendrick^{8,9} sowie Holwerda und Eldering¹⁰ demonstrierten die Nützlichkeit des FA-Verfahrens, obwohl keine vollständige Korrelation zwischen der Agglutinationsmethode und der FA-Technik erzielt werden konnte. Dennoch konnte das FA-Verfahren sowohl glatte als auch grobe *B. pertussis*- und *B. parapertussis*-Kulturen nachweisen und auch auf Direktproben angewandt werden. Weitere Daten zeigten nur geringe oder keine Kreuzreaktionen zwischen Konjugaten aus *B. pertussis*- und *B. parapertussis*-Kulturen. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass die Labortechniker für die Testdurchführung und -auswertung über entsprechende technische Fertigkeiten und Erfahrung verfügen müssen. Der DFA-Test sollte ausschließlich zusätzlich zu und nicht anstelle von Kulturen eingesetzt werden.¹¹ Den Angaben zufolge dürften Laboratorien mit DFA- und Keuchhustenkultur-Erfahrung im Laufe der Zeit und im Vergleich zur Kultivierung eine DFA-Empfindlichkeit von mindestens 60 % sowie eine Spezifität von mindestens 90 % erzielen.¹¹

B. pertussis und *B. parapertussis* sind langsam wachsende Organismen, die sich über 3 – 4 Tage hinweg entwickeln. Durch die Anwendung der Fluoreszenz-Antikörper-Technik lässt sich die für den Nachweis dieser Organismen erforderliche Zeitdauer erheblich reduzieren. Das FA-Verfahren kann auf Direktausstriche des Nasenrachenraums angewandt oder auch zur Identifizierung junger *B. pertussis*- oder *B. parapertussis*-Kulturen eingesetzt werden.

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Die FA-Technik umfasst die Anfertigung eines Ausstrichs der klinischen Probe bzw. des Kulturisolats auf einem gläsernen Objektträger. Es werden 0,5 mL einer Casaminosäuren-Lösung mit Nasenrachenraum-Abstrichen des Patienten beimpft.¹¹ Von dieser Lösung werden Ausstriche angefertigt und mit einem spezifischen, mit einem Leuchtstoff (Fluoresceinisothiocyanat oder FITC) markierten Antikörper gegen *B. pertussis* oder *B. parapertussis* gefärbt. Nach Inkubation mit dem Antikörperpräparat werden die Ausstriche in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen, luftgetrocknet, mit Fluoreszenz-Antikörper-Fixierungsflüssigkeit und Abdeckplättchen bedeckt und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

REAGENZIEN

Difco FA Bordetella Pertussis und **Difco FA Bordetella Parapertussis** sind lyophilisierte, polyklonale, mit Fluorescein konjugierte Hühnerantiseren. Sie wurden, mit Abwandlungen, nach der Methode von Eldering, Eveland und Kendrick^{8,9} sowie von Holwerda und Eldering hergestellt.¹⁰ Als Konservierungsmittel wurde ca. 0,1 % Natriumazid zugesetzt.

Difco FA Buffer, Dried ist eine Phosphatpuffer-NaCl-Mischung, die nach Rehydrierung eine mit Puffer auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellte 0,85%ige Kochsalzlösung ergibt.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 ist standardisiertes analysenreines, auf einen pH-Wert von 7,2 eingestelltes Glycerin.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

In-vitro-Diagnostikum.

Die Verpackung dieses Produkts enthält Naturkautschuk (getrocknet).

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise und der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen erfolgen.^{12,13} Nach Gebrauch sind Proben, Behälter, Objektträger, Rührchen und sonstiges kontaminiertes Material im Autoklaven zu sterilisieren. Die Gebrauchsanleitung ist sorgfältig zu befolgen.

WARNUNG: Dieses Produkt enthält Natriumazid. Sehr giftig beim Einatmen, bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Bei Kontakt mit Säure entstehen hochgiftige Gase. Bei Kontakt mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit sehr viel Wasser nachspülen, um Ansammlungen von Azid zu vermeiden.

Aufbewahrung: Lyophilisiertes **Difco** FA Bordetella Pertussis und **Difco** FA Bordetella Parapertussis bei 2 – 8 °C aufbewahren. Für optimale Stabilität können Teilmengen des titrierten Konjugats in kleine Fläschchen abgefüllt, im unverdünnten Zustand eingefroren und bei Temperaturen von weniger als -20 °C eingefroren werden. Das Konjugat nicht wiederholt einfrieren und auftauen.

Dehydrierten FA Buffer, Dried bei Temperaturen von weniger als 30 °C lagern. Rehydrierten FA Buffer, Dried bei 2 – 8 °C lagern.

FA Mounting Fluid pH 7.2 bei 15 – 30 °C lagern.

Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.

Haltbarkeit des Produkts: Das Verfallsdatum gilt für das im unversehrten Behälter aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften. Zusammenklebendes, verfärbtes oder sonstige Verfallsanzeichen aufweisendes Produkt nicht verwenden.

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Nasenrachenraum-Direktausstriche

1. Einen Nasenrachenraum-Abstrich in 0,5 mL steriler 1%iger **Bacto** Casamino Acids (**Bacto**-Casaminsäuren) emulgieren.¹¹
2. Die Probe nicht länger als 2 h lang in der Casamino Acids-Lösung belassen.
3. Emulgierte Probe auf einem sauberen Mikroskop-Objektträger austreichen.
4. Den Ausstrich an der Luft trocknen lassen und durch vorsichtiges Erwärmen oder 1 min langes Eintauchen in 95%iges Ethanol fixieren.

Kultursolate

1. Zur Isolierung von *Bordetella* aus klinischen Proben sind bestimmte Medien erforderlich, wie bspw. Bordet-Gengou-Agar oder Regan-Lowe-Agar. *B. pertussis*-Kolonien auf Bordet-Gengou-Agar sind sehr klein, weiß, opak, konvex und intakt. Kolonien auf Regan-Lowe-Agar sind rund, gewölbt, quecksilberfarben und glänzend. Spezifische Empfehlungen sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.^{3,11} Sicherstellen, dass eine Reinkultur des Mikroorganismus vorliegt, und dass die biochemischen Testreaktionen der Identifizierung des Organismus als *Bordetella* sp. entsprechen. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann die serologische Identifizierung durchgeführt werden.
2. Geeignete Kolonien wählen und in ca. 2 mL sterilem destilliertem Wasser emulgieren. Die Zelldichte auf ungefähr den McFarland-Trübungsstandard Nr. 1 einstellen.
3. Emulgierte Probe auf einem sauberen Mikroskop-Objektträger austreichen.
4. Den Ausstrich an der Luft trocknen lassen und durch 1 min langes Eintauchen in 95%iges Ethanol fixieren. Objektträger entnehmen und an der Luft trocknen lassen.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: **Difco** FA Bordetella Pertussis, **Difco** FA Bordetella Parapertussis, **Difco** FA Buffer, Dried, **Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2, 1% **Bacto** Casamino Acids

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Fluoreszenzmikroskop-Konfiguration:

Lampen: HBO-50, HBO-100, HBO-200 oder Xenon XBO-150; 6X 5A Wolfram. Anregungswellenlänge: 365 nm. Okular: 10X. Objektiv: 10X, 40X (Fluorit). Filter: BG-12

oder KP490, K515 oder K530. Kondensator: Dunkelfeld D1,20 – 1,40.

Mikroskop-Objektträger, 95%iges Ethanol, Färbungsglas, Deckplättchen, McFarland-Trübungsstandard Nr. 1, Färbungsschale oder Feuchtigkeitschrank.

Vorbereitung der Reagenzien: Vor der Testdurchführung alle Materialien Raumtemperatur annehmen lassen. Sicherstellen, dass alle gläsernen Utensilien und Pipetten sauber sind und keine Rückstände aufweisen (wie z.B. von Reinigungsmitteln).

Zum Rehydrieren von **Difco** FA Bordetella Pertussis und **Difco** FA Bordetella Parapertussis 5 mL steriles destilliertes Wasser zugeben und behutsam drehen, um den Inhalt vollständig zu lösen.

Die Nutzverdünnung des Konjugats ist kurz nach dessen Rehydrierung zu bestimmen. Der Titer eines Konjugats variiert je nach der angewandten Technik, dem verwendeten Fluoreszenz-Mikroskop, dem verwendeten Filter und dem Alter der Lampe.

Das Konjugat sollte unter Heranziehung einer bekannten, dem Konjugat homologen *B. pertussis*- oder *B. parapertussis*-Kultur titriert werden. Konjugatverdünnungen werden in rehydriertem **Difco** FA Buffer hergestellt. (Zur Vorbereitung von FA Buffer, Dried ein Fläschchen bzw. 10 g in 1 L destilliertem Wasser lösen.) Der Titer wird folgendermaßen ermittelt:

Konjugatverdünnung	Fluoreszenz
1:5	4+
1:10	4+
1:20	4+
1:40	4+
1:80	2+

In diesem Beispiel zeigt sich der letzte Fluoreszenzgrad von 4+ bei einer 1:40-Verdünnung des Konjugats. Um einen Sicherheitsbereich einzuräumen, wird die nächste niedrigere Verdünnungsstufe gewählt. Daher ist die Nutzverdünnung in diesem Fall 1:20.

Zum Rehydrieren von FA Buffer, Dried 10 g in 1 L destilliertes Wasser geben und bis zur vollständigen Lösung verrühren.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 ist gebrauchsfertig.

Kontroll-Objektträger: Positive und negative Kontroll-Objektträger mit geeigneten homologen und heterologen Antigenen (d.h. Kulturen) präparieren. Dabei das unter „Probenentnahme und Vorbereitung, Kultursolate“ beschriebene Verfahren anwenden.

TESTVERFAHREN

1. Mehrere Tropfen (ein Tropfen entspricht ~35 µL) des entsprechenden **Difco** FA Bordetella-Konjugats auf den fixierten Ausstrich geben.
2. Das Konjugat auf der Ausstrichoberfläche verteilen.
3. Die Objektträger in eine Färbungsschale oder einen Feuchtigkeitschrank geben.
4. Bei Raumtemperatur 30 min lang inkubieren.
5. Das überschüssige Konjugat entfernen, und den Objektträger 10 min lang in ein Färbungsglas mit **Difco** FA Buffer geben. Dabei den Puffer zweimal wechseln und anschließend 2 min lang in destilliertem Wasser spülen.
6. Den Objektträger entnehmen und abtropfen lassen. Lufttrocknen oder mit saugfähigem Papier trocken tupfen.
7. Einen Tropfen (~35 µL) **Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2 in die Mitte des gefärbten Bereichs geben und mit einem Abdeckblättchen fixieren.
8. Jeden einzelnen Ausstrich unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einem 40X- oder 100X-Objektiv untersuchen. Das Vorhandensein bzw. Fehlen und den Grad der Fluoreszenz dokumentieren.

Qualitätssicherung durch den Anwender

Bei der Anwendung sowohl positive als auch negative Antigen-Kontrollen testen, um die Leistung der Antiseren, die Techniken und die Methodik zu überprüfen.

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

ERGEBNISSE

- Anhand der Fluoreszenzstärke werden die Ergebnisse folgendermaßen abgelesen und dokumentiert:
 - 4+ Maximale Fluoreszenz; leuchtend gelbgrüne periphere Färbung
 - 3+ Helle gelbgrüne periphere Färbung
 - 2+ Eindeutige, jedoch dumpfe gelbgrüne periphere Färbung
 - 1+ Kaum sichtbare periphere Färbung
 - Komplettes Fehlen einer gelbgrünen peripheren Fluoreszenz
- Die positive Kontrolle sollte einen Reaktionsgrad von 4+ mit dem homologen Konjugat zeigen.
- Die negative Kontrolle sollte einen Reaktionsgrad von 1+ mit dem heterologen Konjugat nicht überschreiten.
- Bei den Testausstrichen ist ein Fluoreszenzgrad von 2+ als positives Ergebnis zu erachten.
- Beträgt der Grad der positiven Kontrolle weniger als 3+, oder liegt der Grad der negativen Kontrolle über 1+, hat sich u.U. das Konjugat zersetzt oder der pH-Wert von FA Buffer oder FA Mounting Fluid geändert. Den Test mit frischen Reagenzien wiederholen.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

- Für das Testen von Kulturisolaten sollte Wachstum von antibiotikafreien Medien herangezogen werden, um Autoagglutination zu vermeiden.¹¹
- Zur Beurteilung des Stärkegrads der Fluoreszenz und Außerachtlassung der gelegentlichen unspezifischen Färbung gramnegativer Diplokokken, grampositiver Kokken und coryneform-ähnlicher Stäbchenbakterien ist eine gewisse Erfahrung erforderlich.¹¹
- Beim Testen von Kulturisolaten ist die Dichte der positiven Kontrolle einzustellen, so dass sich bei homologem Konjugat ein Fluoreszenzgrad von 4+ ergibt. Die Dichte der Kulturisolate sollte der positiven Kontrolle vergleichbar sein, um eine Standardisierung der Fluoreszenz zu ermöglichen.
- Alle für Zubereitung, Analyse und Lagerung dieser Reagenzien verwendeten Glasutensilien müssen frei von Reinigungsmittelrückständen oder sonstigen nachteiligen Rückständen sein.
- Die Fluoreszenz-Antikörper-Technik ermöglicht nur eine präsumtive Identifizierung von *B. pertussis* oder *B. parapertussis*. Ein negatives Ergebnis ist nicht als schlüssig anzusehen, da diese Art von Reaktion bei Vorliegen von nur einigen wenigen Organismen in der Probe eintreten kann. Für die endgültige Identifizierung müssen biochemische, morphologische und serologische Eigenschaften berücksichtigt werden.
- Bei kleiner Zellpopulation in einer *B. bronchiseptica*-Suspension können bei allen Konjugatverdünnungen Kreuzreaktionen mit verschiedenen Färbungsgraden auftreten.
- Die Reaktion für sowohl **Difco** FA Bordetella Pertussis als auch **Difco** FA Bordetella Parapertussis sollte bei glatten Stämmen homologer Kulturen leuchtend und spezifisch ausfallen. Bei manchen heterologen Stämmen kann eine Reaktion des Grades 1+ auftreten. Derartige minimale Reaktionen dürften die Interpretation der Testergebnisse nicht beeinträchtigen.

LEISTUNGSMERKMALE¹⁴

Die Leistung von **Difco** FA Bordetella Pertussis (DFA), hergestellt von Difco Laboratories, einer Tochtergesellschaft von Becton, Dickinson and Company, wurde im Rahmen einer Studie von Loeffelholz, Thompson, Long und Gilchrist mit Kulturen

und einem hausintern entwickelten PCR-Assay verglichen.¹⁴ Bei dieser Studie wurden dreihundertundneunzehn (319) Nasenrachenraum-Abstrichprobenpaare auf *B. pertussis* getestet. Die Ergebnisse dieser Studie sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Methode	Empfindlichkeit*	Spezifität
Kultur	15,2 %	100 %
DFA	52,2 %	98,2 %
PCR	93,5 %	97,1 %

*Anhand von 46 positiven Proben, die entweder (i) kulturpositiv, (ii) PCR- und DFA-positiv oder (iii) PCR- oder DFA-positiv waren, bei klinischen Merkmalen für Keuchhusten.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr. Beschreibung

223591	Difco FA Bordetella Pertussis, 5 mL
223781	Difco FA Bordetella Parapertussis, 5 mL
223143	Difco FA Buffer, Dried, 6 x 10 mL
223142	Difco FA Buffer, Dried, 100 g
223050	Bacto Casamino Acids, 500 g

LITERATUR: S. „References“ im englischen Text.



BD Difco FA Bordetella Pertussis Difco FA Bordetella Parapertussis

Italiano

USO PREVISTO

L'uso di **Difco FA Bordetella Pertussis** e **Difco FA Bordetella Parapertussis** è raccomandato nella procedura anticorpale in fluorescenza diretta per l'identificazione di *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Tutti i membri del genere *Bordetella* sono patogeni respiratori degli animali a sangue caldo. *B. pertussis* e *B. parapertussis* sono due specie di *Bordetella* esclusivamente patogeni per l'uomo. Questi microrganismi aderiscono, si moltiplicano e restano localizzati nelle cellule epiteliali cigliate delle vie respiratorie. *B. pertussis* è la causa principale della tosse canina o pertosse, mentre *Bordetella parapertussis* è associato a una forma più lieve e meno frequente della malattia.¹ La trasmissione interumana avviene per via aerea.

La pertosse è una malattia estremamente contagiosa che colpisce oltre il 90% della popolazione non immunizzata.² La principale caratteristica distintiva di *B. pertussis* è la produzione di tossine. La pertosse classica causata da *B. pertussis* si articola in tre stadi. Il primo stadio – o stadio catarrale – è caratterizzato da sintomi non specifici simili a quelli di una virosi o di un raffreddore. In questo stadio, la malattia è altamente contagiosa e dura 1 – 2 settimane. Nel secondo stadio, detto anche parossistico, la tosse aumenta di intensità e frequenza. Questo stadio è contraddistinto da accessi improvvisi di tosse secca ricorrente, spesso accompagnati dal caratteristico stridore,³ causato dalla rapida inspirazione d'aria dopo la clearance del muco dalle vie respiratorie. Questo stadio può durare da 1 a 4 settimane. L'inizio della fase di convalescenza è contraddistinto da una riduzione della frequenza e della gravità degli accessi di tosse. La guarigione completa può richiedere settimane o mesi.

Nonostante la disponibilità di un efficace vaccino a cellule intere, la pertosse resta una malattia a distribuzione globale perché molte nazioni in via di sviluppo non hanno le risorse per vaccinare le rispettive popolazioni.⁴ Gravi epidemie si sono registrate anche in nazioni sviluppate, come per esempio Gran Bretagna e Svezia. La pertosse è endemica negli Stati Uniti, dove si verifica in prevalenza sotto forma di casi isolati. Si è registrata una variazione nella fascia di età colpita dalla malattia. In passato, i bambini di età da 1 a 5 anni erano più soggetti alla pertosse. I bambini di età inferiore a un anno² sono diventati più suscettibili alla malattia a causa della riduzione degli anticorpi materni trasferiti passivamente, dovuta alla mancata somministrazione di vaccinazioni di richiamo agli adulti.

Le specie del genere *Bordetella* sono minuscoli coccobacilli gram-negativi che si presentano singolarmente o in coppia e possono evidenziare un aspetto bipolare. Sono rigorosamente aerobi e alcuni membri del genere sono motili. *B. pertussis* e *B. parapertussis* non sono motili e non producono acido da carboidrati. *B. pertussis* non cresce su comuni basi agar sangue o agar cioccolato, mentre *B. parapertussis* cresce su agar sangue e talvolta su agar cioccolato. I terreni per l'isolamento primario sono a base di infuso di patata, come per esempio il terreno Bordet-Gengou (BG), oppure a base di carbone, come il terreno Regan-Lowe (RL), supplementati con glicerolo, peptoni e sangue di cavallo o montone.³ Per ridurre la crescita della normale flora, viene spesso aggiunto un antibiotico. *B. pertussis* può essere isolata da secreti del nasofaringe posteriore, da lavaggio broncoalveolare e da campioni transbronchiali.

Da molti anni, il test anticorpale in fluorescenza diretta (DFA) viene impiegato – con vari livelli di successo – per la rilevazione rapida diretta di *B. pertussis* e *B. parapertussis* in campioni nasofaringei.⁵⁻⁷ Eldering, Eveland e Kendrick^{8,9} e Holwerda ed Eldering¹⁰ hanno dimostrato l'utilità della procedura FA, pur non ottenendo

una correlazione completa tra la metodica di agglutinazione e la tecnica FA. Ciò nonostante, la procedura FA è riuscita a rilevare colture omogenee e disomogenee di *B. pertussis* e *B. parapertussis* e ha potuto essere applicata a campioni diretti. Altri dati ottenuti hanno evidenziato reattività crociata minima o inesistente tra coniugati preparati da colture di *B. pertussis* e *B. parapertussis*. Lo svantaggio di questa procedura è rappresentato dalla capacità tecnica e dall'esperienza richieste ai tecnici per l'esecuzione e la lettura del test. La DFA deve essere sempre usata in combinazione con una coltura, e non in sua sostituzione.¹¹ È stato suggerito che i laboratori esperti in metodiche culturali e DFA per la pertosse debbano ottenere una sensibilità DFA uguale o superiore al 60% e una specificità di almeno il 90% nel tempo rispetto alla metodica culturale.¹¹

B. pertussis e *B. parapertussis* sono microrganismi a crescita lenta che si sviluppano in 3 – 4 giorni. L'impiego della tecnica anticorpale in fluorescenza consente di ridurre significativamente il tempo richiesto per la rilevazione di questi microrganismi. La procedura FA può essere applicata a strisci nasofaringei diretti o impiegata per identificare colture giovani di *B. pertussis* o *B. parapertussis*.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La tecnica FA prevede la preparazione di uno striscio dal campione clinico o dall'isolato culturale su un vetrino in vetro. I tamponi faringei vengono ottenuti dal paziente e inoculati in 0,5 mL di soluzione di Casamino Acids.¹¹ Gli strisci vengono eseguiti da questa soluzione e colorati con un anticorpo specifico marcato con un marker fluorescente (isotiocianato di fluoresceina o FITC) diretto contro *B. pertussis* o *B. parapertussis*. Dopo l'incubazione con la preparazione anticorpale, gli strisci vengono lavati in soluzione fisiologica tamponata con fosfato, asciugati all'aria, coperti con un vetrino coprioggetti con Fluorescent-Antibody Mounting Fluid ed esaminati con un microscopio a fluorescenza.

REAGENTI

Difco FA Bordetella Pertussis e **Difco FA Bordetella Parapertussis** sono antisieri di pollo liofilizzati, policlonali, coniugati con fluoresceina, preparati con le modificazioni conformi alla metodica di Eldering, Eveland e Kendrick^{8,9} e Holwerda e Eldering.¹⁰ Come conservante, è aggiunta sodio azide approssimativamente allo 0,1%.

Difco FA Buffer, Dried è una miscela tampone fosfato-NaCl che, una volta reidratata, produce una soluzione fisiologica allo 0,85% tamponata a pH 7,2.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 è una glicerina standardizzata, grado reagente, corretta a un pH 7,2.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

La confezione di questo prodotto contiene gomma naturale secca.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici.^{12,13} Dopo l'uso, sterilizzare in autoclave campioni, contenitori, vetrini, provette e tutti gli altri materiali contaminati. Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene sodio azide. La sodio azide è tossica se inalata, a contatto con la pelle o ingerita. A contatto con acido, libera gas estremamente tossici. In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente e abbondantemente con acqua. La sodio azide può reagire con il piombo e il rame delle tubature, formando azidi metalliche altamente esplosive. Eliminare la sodio azide facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi per impedire l'accumulo di azidi.

Conservazione – Conservare **Difco FA Bordetella Pertussis** e **Difco FA Bordetella Parapertussis** liofilizzati a 2 – 8 °C. Per garantire una stabilità ottimale, le aliquote di coniugato titolato possono essere versate in

piccoli flaconi, congelate allo stato non diluito e conservate a una temperatura inferiore a -20°C. Non sottoporre il coniugato a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Conservare FA Buffer, Dried, a una temperatura inferiore a 30 °C. Conservare FA Buffer, Dried, reidratato a 2 – 8 °C.

Conservare FA Mounting Fluid pH 7.2 a 15 – 30 °C.

L'esposizione prolungata dei reagenti a temperature diverse da quelle indicate può danneggiare i prodotti.

Deterioramento del prodotto – La data di scadenza si riferisce al prodotto in confezione integra e conservato come prescritto. Non usare il prodotto se appare indurito, scolorito o presenta altri segni di deterioramento.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Strisci nasofaringei diretti

1. Raccogliere un tampone nasofaringeo ed emulsionare in 0,5 mL di soluzione **Bacto Casamino Acids** all'1% sterile.¹¹
2. Tenere il campione in soluzione Casamino Acids per non più di 2 h.
3. Strisciare il campione emulsionato su un vetrino pulito per microscopio.
4. Lasciare asciugare lo striscio all'aria e fissare riscaldando delicatamente oppure immergendo per 1 min in etanolo al 95%.

Isolati colturali

1. L'isolamento di *Bordetella* da campioni clinici richiede l'uso di particolari terreni, come l'agar Bordet-Gengou o l'agar Regan-Lowe. Le colonie di *B. pertussis* su agar Bordet-Gengou sono minute, bianche, opache, convesse e intere, mentre quelle su agar Regan-Lowe sono rotonde, semisferiche, di colore argento-mercurio e brillanti. Per le raccomandazioni specifiche, consultare la documentazione appropriata.^{3,11} Verificare che sia stata ottenuta una coltura pura del microorganismo e che le reazioni biochimiche siano congruenti con l'identificazione dell'organismo come *Bordetella* spp. Una volta soddisfatti questi criteri, è possibile eseguire l'identificazione sierologica.
2. Selezionare le colonie appropriate ed emulsionare in circa 2 mL di acqua sterile purificata. Correggere la densità cellulare in modo da approssimare lo standard di torbidità McFarland n. 1.
3. Strisciare il campione emulsionato su un vetrino pulito per microscopio.
4. Lasciare asciugare lo striscio all'aria e fissare immergendo per 1 min in etanolo al 95%. Rimuovere i vetrini e lasciarli asciugare all'aria.

PROCEDURA

Materiali forniti – **Difco** FA Bordetella Pertussis, **Difco** FA Bordetella Parapertussis, **Difco** FA Buffer, Dried, **Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2, 1% **Bacto** Casamino Acids

Materiali necessari ma non forniti

Microscopio a fluorescenza:

Lampade: HBO-50, HBO-100, HBO-200 o XBO-150 allo xeno; 6X 5A al tungsteno. Lunghezza d'onda di eccitazione: 365 nm. Oculare: 10X. Obiettivo: 10X, 40X (fluorite). Filtri: BG-12 o KP490, K515 o K530. Condensatore: campo scuro D1.20-1.40.

Vetrini per microscopio, etanolo al 95%, recipiente per colorazione, vetrini coprioggetti, standard di torbidità McFarland n. 1, vassoio per colorazione o camera di umidificazione.

Preparazione dei reagenti – Prima di eseguire i test, lasciare equilibrare tutti i materiali a temperatura ambiente. Assicurarsi che la vetreria e le pipette siano pulite e prive di residui di detergenti o altro.

Per reidratare **Difco** FA Bordetella Pertussis e **Difco** FA Bordetella Parapertussis, dispensare 5 mL di acqua sterile purificata e roteare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto.

Determinare la diluizione di lavoro del coniugato subito dopo la reidratazione. Il titolo di un coniugato varia in relazione alla tecnica adottata, al microscopio a fluorescenza e al filtro usati e all'età del bulbo.

Titolare il coniugato usando una coltura conosciuta di *B. pertussis* o *B. parapertussis*

omologa al coniugato. Le diluizioni del coniugato si effettuano in **Difco** FA Buffer reidratato. (Preparare FA Buffer, Dried dissolvendo un flacone o 10 g in 1 L di acqua purificata.) Il titolo viene determinato nel modo seguente.

Diluizione del coniugato	Fluorescenza
1:5	4+
1:10	4+
1:20	4+
1:40	4+
1:80	2+

In questo esempio, l'ultima fluorescenza 4+ si riscontra in una diluizione 1:40 del coniugato. Per assicurare un margine di sicurezza, si sceglie una diluizione in meno e pertanto in questo caso la diluizione di lavoro è 1:20.

Per reidratare Fa Buffer, Dried, dispensare 10 g in 1 L di acqua purificata e agitare sino al dissolvimento completo.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 è pronto per l'uso.

Vetrini di controllo – Preparare i vetrini di controllo positivo e negativo usando antigeni omologhi ed eterologhi appropriati (ossia colture), rispettando la procedura illustrata in "Raccolta e preparazione dei campioni, Isolati colturali".

Procedura del test

1. Dispensare alcune gocce (una goccia equivale a ~35 µL) del coniugato **Difco** FA Bordetella appropriato sullo striscio fissato.
2. Distribuire il coniugato sulla superficie dello striscio.
3. Porre i vetrini in un vassoio di colorazione o in una camera di umidificazione.
4. Incubare a temperatura ambiente per 30 min.
5. Rimuovere il coniugato in eccesso e porre per 10 min il vetrino in un recipiente per colorazione contenente **Difco** FA Buffer, eseguire 2 cambi di tampone seguiti da 1 risciacquo in acqua purificata per 2 min.
6. Rimuovere il vetrino e lasciarlo drenare e asciugare all'aria oppure tamponarlo con carta assorbente.
7. Dispensare una goccia (~35 µL) di **Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2 al centro dell'area colorata e coprire con un vetrino coprioggetti.
8. Esaminare ogni striscio usando un microscopio a fluorescenza con una lunghezza d'onda di eccitazione di 365 nm e un obiettivo da 40X o 100X. Annotare la presenza o assenza e il grado di fluorescenza.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Al momento dell'uso, testare entrambi i controlli di antigene positivo e negativo per verificare prestazioni degli antisieri, tecniche e metodologia.

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

RISULTATI

1. Leggere e annotare i risultati nel modo seguente, in base all'intensità della fluorescenza.
 - 4+ Fluorescenza massima; colorazione periferica giallo – verde brillante
 - 3+ Colorazione periferica giallo – verde brillante
 - 2+ Colorazione periferica giallo – verde definita ma opaca
 - 1+ Colorazione periferica scarsamente visibile
 - Assenza completa di fluorescenza periferica giallo – verde
2. Il controllo positivo deve evidenziare una reazione 4+ con il coniugato omologo.
3. Il controllo negativo non deve superare una reazione 1+ con il coniugato eterologo.
4. Per gli strisci sottoposti al test, una fluorescenza 2+ deve essere considerata un risultato positivo.

- Un controllo positivo inferiore a 3+ o un controllo negativo superiore 1+ è indice di un possibile deterioramento del coniugato o di una variazione del pH in FA Buffer o FA Mounting Fluid. Ripetere il test con reagenti nuovi.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Quando si testano isolati colturali, usare la crescita da terreni non antibiotati per evitare l'autoagglutinazione.¹¹
- Per classificare l'intensità della fluorescenza e ignorare l'occasionale colorazione non specifica di diplococchi gram-negativi, cocchi gram-positivi e bacilli difteroido-simili, è necessaria una certa esperienza.¹¹
- Quando si testano isolati colturali, correggere la densità del controllo positivo per ottenere una fluorescenza 4+ con il coniugato omologo. Per standardizzare la fluorescenza, la densità degli isolati colturali deve essere comparabile al controllo positivo.
- Tutta la vetreria impiegata nella preparazione, nei test e nella conservazione di questi reagenti deve essere priva di detergenti o altri residui nocivi.
- La tecnica anticorpale in fluorescenza può fornire soltanto un'indicazione presuntiva di *B. pertussis* o *B. parapertussis*. Un risultato negativo non deve essere considerato definitivo in quanto questo tipo di reazione può verificarsi quando nel campione sono presenti solo pochi microrganismi. L'identificazione finale può essere effettuata soltanto dopo aver valutato le caratteristiche morfologiche, sierologiche e biochimiche.
- Reazioni crociate di intensità di colorazione variabili possono verificarsi con una piccola popolazione di cellule in una sospensione *B. bronchiseptica* con una diluizione qualsiasi del coniugato.
- Con ceppi omogenei di colture omologhe, la reazione per **Difco** FA Bordetella Pertussis e **Difco** FA Bordetella Parapertussis deve essere brillante e specifica. Con alcuni ceppi eterologhi si può verificare una reazione 1+. Tali reazioni minime non dovrebbero interferire con l'interpretazione dei risultati del test.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE¹⁴

Le prestazioni metodologiche di **Difco** FA Bordetella Pertussis (DFA), prodotto da Difco Laboratories, una controllata di Becton, Dickinson and Company, sono state comparate a metodiche colturali e a un dosaggio PCR sviluppato all'interno, in uno studio condotto da Loeffelholz, Thompson, Long e Gilchrist,¹⁴ nel corso del quale trecentodiciannove (319) coppie di campioni da tamponi nasofaringei sono state testate per la presenza di *B. pertussis*. La tabella seguente riassume i risultati di questo studio.

Metodica	Sensibilità*	Specificità
Coltura	15,2%	100%
DFA	52,2%	98,2%
PCR	93,5%	97,1%

*In base a 46 campioni positivi risultati (i) positivi alla coltura, (ii) PCR- e DFA-positivi, oppure (iii) PCR- o DFA-positivi, con caratteristiche cliniche di pertosse.

DISPONIBILITÀ

N. di cat. Descrizione

- 223591 **Difco** FA Bordetella Pertussis, 5 mL
- 223781 **Difco** FA Bordetella Parapertussis, 5 mL
- 223143 **Difco** FA Buffer, Dried, 6 x 10 mL
- 223142 **Difco** FA Buffer, Dried, 100 g
- 223050 **Bacto** Casamino Acids, 500 g

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.



BD Difco FA Bordetella Pertussis

Difco FA Bordetella Parapertussis

Español

USO PREVISTO

Se recomienda el uso de **Difco FA Bordetella Pertussis** y **Difco FA Bordetella Parapertussis** en la técnica de anticuerpos con fluorescencia directa para la identificación de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.

RESUMEN Y EXPLICACION

Todos los miembros del género *Bordetella* son patógenos respiratorios de los animales de sangre caliente. *B. pertussis* y *B. parapertussis* son dos especies de *Bordetella* que son patógenos únicamente de los seres humanos. Estos organismos se adhieren a las células epiteliales ciliadas de las vías respiratorias, se multiplican entre ellas y permanecen allí. *B. pertussis* es la causa más importante de la tos ferina o pertussis. *Bordetella parapertussis* se asocia con una forma más leve y menos frecuente de la enfermedad¹. La vía de transmisión de una persona a otra tiene lugar mediante la producción de aerosoles.

Pertussis es una enfermedad muy contagiosa que ataca a más del 90% de las poblaciones no vacunadas². La producción de toxinas sigue siendo la característica distintiva más importante de *B. pertussis*. La pertussis clásica causada por *B. pertussis* se produce en tres etapas. La primera etapa (de catarro) se caracteriza por síntomas no específicos similares a un resfriado o infección viral. La enfermedad es muy contagiosa durante esta etapa, y dura entre 1 y 2 semanas. En la segunda etapa (convulsiva), la tos aumenta de intensidad y frecuencia. Esta etapa está marcada por ataques súbitos de tos grave y repetitiva, que a menudo se combina con la convulsión característica³. El sonido de sibilancia es causado por la inspiración rápida de aire después de desobstruirse las vías respiratorias bloqueadas por la mucosidad. Esta etapa puede durar entre 1 y 4 semanas. El comienzo de la etapa de convalecencia está marcado por una reducción en la frecuencia y gravedad de los ataques de tos. Pueden ser necesarios semanas o meses para una recuperación completa.

A pesar de la disponibilidad de una vacuna eficaz de célula entera, la pertussis sigue siendo una enfermedad mundial debido a que numerosos países en desarrollo no poseen los recursos para vacunar a su población⁴. Incluso en naciones desarrolladas tales como Gran Bretaña y Suecia, han ocurrido brotes importantes. La pertussis es endémica en Estados Unidos, donde la mayoría de los casos son aislados. Se ha producido un cambio en el grupo de edad afectado por la enfermedad. Anteriormente, los niños de 1 y 5 años de edad eran más propensos a sufrir la pertussis. Los niños de menos de un año de edad² se han vuelto más sensibles a la enfermedad, debido a una reducción en los anticuerpos maternos de transmisión pasiva, porque los adultos no reciben vacunas de refuerzo.

Bordetella son bacilocosos minúsculos gram negativos que ocurren individualmente o en pares, y que pueden presentar un aspecto bipolar. Son aerobios estrictos y algunos de los miembros del género son móviles.

B. pertussis y *B. parapertussis* no son móviles y no producen ácido de los carbohidratos. *B. pertussis* no crece en las bases de agar común ni en agar chocolate, mientras que *B. parapertussis* crece en agar sangre y a veces en agar chocolate. Los medios para el aislamiento primario están formados por medios con base de infusión de patata, tal como el medio Bordet-Gengou (BG) o los medios con base de carbón tal como el medio Regan-Lowe (RL) suplementado con glicerol, peptonas y sangre de caballo o de carnero³. A menudo se añade un agente antibiótico para reducir el crecimiento de la flora normal. *B. pertussis* puede recuperarse de secreciones recogidas de las muestras de nasofaringe posterior, lavado broncoalveolar y transbronqueal.

La prueba de anticuerpos con fluorescencia directa (DFA) se ha utilizado durante muchos años con diferentes niveles de éxito para la detección rápida y directa de *B. pertussis* y

B. parapertussis en muestras nasofaríngeas⁵⁻⁷. Eldering, Eveland y Kendrick^{8,9} y Holwerda y Eldering¹⁰ demostraron la utilidad del procedimiento de FA, aunque no se obtuvo una correlación completa entre el método de aglutinación y la técnica de FA. No obstante, el procedimiento de FA pudo detectar los cultivos lisos y los rugosos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* y también pudo aplicarse a las muestras directas. Los datos adicionales obtenidos mostraron reacciones cruzadas escasas o nulas entre los conjugados preparados de cultivos de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. La desventaja de este procedimiento es que se requieren habilidad y experiencia técnicas de los técnicos para realizar las pruebas y efectuar la lectura de las mismas. La prueba de DFA siempre tiene que realizarse simultáneamente con el cultivo y no debe reemplazar a éste¹¹. Se ha sugerido que los laboratorios con experiencia y capacidad en la prueba de DFA y cultivo de pertussis deben obtener una sensibilidad con la prueba de DFA del 60% o más y una especificidad de al menos 90% con el tiempo, comparado con el cultivo¹¹.

B. pertussis y *B. parapertussis* son organismos de crecimiento lento, que se desarrollan en 3 – 4 días. Al emplear la técnica de anticuerpos con fluorescencia, el tiempo necesario para detectar estos organismos puede reducirse significativamente. El procedimiento de FA puede aplicarse a los frotis nasofaríngeos directos o puede utilizarse para identificar cultivos de poca antigüedad de *B. pertussis* o *B. parapertussis*.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La técnica de FA implica la preparación de un frotis a partir de la muestra clínica o aislado de cultivo en un portaobjetos de vidrio. Se obtienen torundas nasofaríngeas del paciente y se inoculan en 0,5 mL de solución de Casaminoácidos¹¹. Se realizan frotis a partir de esta solución y se hace la tinción con un anticuerpo específico rotulado con un marcador fluorescente (isotiocianato de fluoresceína o FITC) dirigido contra *B. pertussis* o *B. parapertussis*. Después de la incubación con la preparación de anticuerpos, los frotis se lavan en solución salina con tampón de fosfato, se dejan secar al aire, se cubren con líquido de preparación de anticuerpos con fluorescencia y se examinan con un microscopio de fluorescencia.

REACTIVOS

Difco FA Bordetella Pertussis y **Difco FA Bordetella Parapertussis** son antisueros de pollo liofilizados, policlonales y conjugados con fluoresceína. Fueron preparados con modificaciones según el método de Eldering, Eveland y Kendrick^{8,9} y Holwerda y Eldering¹⁰. Se añade aproximadamente 0,1% de azida sódica como conservante.

Difco FA Buffer, Dried es una mezcla de NaCl y tampón de fosfato que, al rehidratarse, produce una solución salina al 0,85% tamponada para lograr un pH de 7,2.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 es glicerina normalizada de grado analítico ajustada a un pH de 7,2.

Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

El envase de este producto contiene goma natural seca.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todos los procedimientos^{12,13}. Después del uso, se deberán esterilizar muestras, envases, portaobjetos, tubos y demás material contaminado en autoclave. Es necesario seguir al pie de la letra las instrucciones de uso.

ADVERTENCIA: Este producto contiene azida sódica. La azida sódica es tóxica en caso de inhalación, contacto con la piel e ingestión. El contacto con ácidos libera un gas muy tóxico. En caso de contacto con la piel, lavar de inmediato el área afectada con abundante agua. La azida sódica puede

reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar el material por el desagüe, utilizar un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azidas.

Almacenamiento: Almacenar **Difco** FA Bordetella Pertussis y **Difco** FA Bordetella Parapertussis, liofilizados, a una temperatura de 2 – 8 °C. Pueden colocarse alícuotas del conjugado titulado en frascos pequeños, congelarse sin diluir y almacenarse a una temperatura inferior a -20 °C para una estabilidad óptima. El conjugado no debe congelarse y descongelarse repetidas veces.

Almacenar FA Buffer, Dried, deshidratado, a una temperatura inferior a 30 °C. Almacenar FA Buffer, Dried, rehidratado, a una temperatura de 2 – 8 °C.

Almacenar FA Mounting Fluid pH 7.2 a 15 – 30 °C.

Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.

Deterioro del producto: La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada. No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro.

RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Frotis nasofaríngeos directos

1. Obtener una torunda nasofaríngea y emulsionar en 0,5 mL de 1% **Bacto** Casamino Acids estériles¹¹.
2. Conservar la muestra en solución de casaminoácidos por no más de 2 h.
3. Realizar el frotis de la muestra emulsionada en un portaobjetos de microscopio limpio.
4. Dejar que el frotis se seque al aire y fijar con calor suave o con 1 min de inmersión en etanol al 95%.

Aislados de cultivo

1. El aislamiento de *Bordetella* a partir de muestras clínicas requiere el uso de determinados medios, tales como el agar Bordet-Gengou o el agar Regan-Lowe. Las colonias de *B. pertussis* en agar Bordet-Gengou son muy pequeñas, blancas, opacas, convexas y enteras. Las colonias en agar Regan-Lowe son redondas, con forma de cúpula, de color plateado como el mercurio y brillantes. Consultar en las referencias correspondientes las recomendaciones específicas^{3,11}. Determinar que se haya obtenido un cultivo puro del microorganismo y que las reacciones de las pruebas bioquímicas sean coherentes con la identificación del organismo como perteneciente a la especie *Bordetella*. Una vez satisfechos estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.
2. Seleccionar las colonias adecuadas y emulsionar en aproximadamente 2 mL de agua purificada estéril. Ajustar la densidad celular a aproximadamente el patrón de turbidez N° 1 de McFarland.
3. Realizar el frotis de la muestra emulsionada en un portaobjetos de microscopio limpio.
4. Dejar que el frotis se seque al aire y fijar con 1 min de inmersión en etanol al 95%. Retirar los portaobjetos y dejar que se sequen al aire.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: **Difco** FA Bordetella Pertussis, **Difco** FA Bordetella Parapertussis, **Difco** FA Buffer, Dried, **Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2, 1% **Bacto** Casamino Acids

Materiales necesarios pero no suministrados

Microscopio de fluorescencia:

Lámparas: HBO-50, HBO-100, HBO-200 o Xenon XBO-150; 6X 5A Tungsten. Longitud de onda de excitación: 365 nm. Ocular: 10X. Objetivo: 10X, 40X (fluorita). Filtros: BG-12 o KP490, K515 o K530. Condensador: De campo oscuro D1,20 – 1,40.

Portaobjetos de microscopio, etanol al 95%, jarra de tinción, cubiertas, patrón de turbidez

N° 1 de McFarland, bandeja de tinción o cámara húmeda.

Preparación del reactivo: Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente antes de realizar las pruebas. Asegurarse de que el material de vidrio y las pipetas estén limpios y libres de residuos, como, por ejemplo, detergente.

Para rehidratar **Difco** FA Bordetella Pertussis y **Difco** FA Bordetella Parapertussis, añadir 5 mL de agua purificada estéril y girar suavemente para disolver el contenido por completo.

La dilución de trabajo del conjugado debe determinarse inmediatamente después de su rehidratación. La titulación de un conjugado varía con la técnica, el microscopio de fluorescencia y el filtro utilizados, además de la antigüedad de la pera.

Debe determinarse la titulación del conjugado mediante un cultivo conocido de *B. pertussis* o *B. parapertussis* homólogos al conjugado. Se realizan diluciones del conjugado en **Difco** FA Buffer rehidratado. (Preparar FA Buffer, Dried disolviendo un vial o 10 g en 1 L de agua purificada.) La titulación se determina de la manera siguiente:

Dilución del conjugado	Fluorescencia
1:5	4+
1:10	4+
1:20	4+
1:40	4+
1:80	2+

En este ejemplo, la última fluorescencia de 4+ se encuentra en una dilución de 1:40 del conjugado. Se selecciona una dilución menos para tener un margen de seguridad. Por tanto, la solución de trabajo en este caso es de 1:20.

Para rehidratar FA Buffer, Dried, añadir 10 g a 1 L de agua purificada y revolver hasta que se disuelva por completo.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 está listo para usar.

Portaobjetos de control: Preparar portaobjetos de control positivos y negativos con antígenos homólogos y heterólogos apropiados (es decir, cultivos), siguiendo el procedimiento que se detalla en "Recogida y preparación de muestras, aislados de cultivo".

Procedimiento de análisis

1. Añadir varias gotas (una gota equivale a 35 µL aproximadamente) del conjugado **Difco** FA Bordetella apropiado para el frotis fijado.
2. Esparcir el conjugado sobre la superficie del frotis.
3. Colocar el portaobjetos en una bandeja de tinción o cámara húmeda.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
5. Quitar el exceso de conjugado y colocar el portaobjetos en una jarra de tinción con **Difco** FA Buffer durante 10 min; cambiar el tampón 2 veces y luego enjuagar 1 vez en agua purificada durante 2 min.
6. Retirar el portaobjetos y dejar drenar y secar al aire, o secar con papel absorbente.
7. Añadir una gota (35 µL aproximadamente) de **Difco** FA Mounting Fluid pH 7,2 al centro del área de tinción y colocar una cubierta encima.
8. Examinar cada frotis con microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 365 nm y objetivo de 40X o 100X. Registrar la presencia o ausencia de fluorescencia.

Control de calidad del usuario

En el momento de uso, aplicar controles de antígeno tanto positivo como negativo para comprobar el rendimiento de los antisueros, las técnicas y la metodología.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad de laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de CLSI y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

1. Efectuar la lectura y registrar los resultados basándose en la intensidad de la fluorescencia de la siguiente manera:
 - 4+ Fluorescencia máxima; tinción periférica brillante de color amarillo verdoso
 - 3+ Tinción periférica brillante de color amarillo verdoso
 - 2+ Tinción periférica definida pero opaca de color amarillo verdoso
 - 1+ Tinción periférica apenas visible
 - Ausencia completa de fluorescencia periférica de color amarillo verdoso
2. El control positivo debe mostrar una reacción de 4+ con el conjugado homólogo.
3. El control negativo no debe superar una reacción de 1+ con el conjugado heterólogo.
4. Para el frotis de prueba, una fluorescencia de 2+ debe considerarse como resultado positivo.
5. Si el control positivo es inferior a 3+, o si el control negativo es superior a 1+, el conjugado tal vez se haya deteriorado o el pH haya cambiado en el FA Buffer o FA Mounting Fluid. Repetir la prueba con reactivos nuevos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Al analizar los aislados de cultivo, debe utilizarse crecimiento de medios sin antibióticos para evitar la autoaglutinación¹¹.
2. Se requiere algo de experiencia para evaluar la intensidad de la fluorescencia y desestimar la tinción no específica ocasional de diplococos gram negativos, cocos gram positivos y bacilos similares a difteroides¹¹.
3. Al analizar aislados de cultivo, la densidad del control positivo debe ajustarse para producir una fluorescencia de 4+ con conjugado homólogo. La densidad de los aislados de cultivo debe ser comparable con el control positivo para normalizar la fluorescencia.
4. Los materiales de vidrio empleados en la preparación, el análisis y el almacenamiento de estos reactivos no deben contener detergentes ni otros residuos nocivos.
5. La técnica de anticuerpos con fluorescencia puede proporcionar sólo una identificación presuntiva de *B. pertussis* o *B. parapertussis*. Un resultado negativo no debe considerarse concluyente, ya que este tipo de reacción puede ocurrir cuando en la muestra se encuentran presentes sólo algunos organismos. La identificación final se puede realizar sólo después de considerar las características bioquímicas, morfológicas y serológicas.
6. Son posibles las reacciones cruzadas con tinciones de intensidad diversa en una población pequeña de células en una suspensión de *B. bronchiseptica* en cualquier dilución del conjugado.
7. Para **Difco** FA Bordetella Pertussis y **Difco** FA Bordetella Parapertussis, la reacción debe ser brillante y específica, con cepas lisas de cultivos homólogos. Con algunas cepas heterólogas, es posible una reacción de 1+. Dichas reacciones mínimas no deben interferir con la interpretación de los resultados de las pruebas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO¹⁴

El rendimiento de **Difco** FA Bordetella Pertussis (DFA), fabricado por Difco Laboratories, una subsidiaria de Becton, Dickinson and Company, se comparó con cultivo y un análisis PCR interno en un estudio realizado por Loeffelholz, Thompson, Long y Gilchrist¹⁴. Se analizaron 319 muestras de torundas nasofaríngeas en pares para determinar la presencia de *B. pertussis* en este estudio. Los resultados de este estudio se resumen en la tabla siguiente:

Método	Sensibilidad*	Especificidad
Cultivo	15,2%	100%
DFA	52,2%	98,2%
PCR	93,5%	97,1%

*Basada en 46 muestras positivas que dieron resultado (i) positivo en cultivo, (ii) positivo con PCR y DFA, o (iii) positivo con PCR o DFA, con características clínicas indicativas de pertussis.

DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

223591	Difco FA Bordetella Pertussis, 5 mL
223781	Difco FA Bordetella Parapertussis, 5 mL
223143	Difco FA Buffer, Dried, 6 x 10 mL
223142	Difco FA Buffer, Dried, 100 g
223050	Bacto Casamino Acids, 500 g

REFERENCIAS: Ver "References" en el texto en inglés.



Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производитель / Producător / Üretici / Proizvođač / Производитель / Атқарушы



Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použít do / Usar antes de / Använd före / Используйте до / A se utiliza până la / Son kullanma tarihi / Upotrebiti do / Использовать до / дейін пайдалануға / Upotrijebiti do /
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
 ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutning af måned) /
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mensesio pabaiga) /
 ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutten av måneden) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu) /
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
 ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutet på månaden) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /
 ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) /
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalogusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo / Каталоген номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу / Каталог нөмірі



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő a Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизиран представител в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćení představník v Evropské unii / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / Medicínska pomagala za In Vitro Dijagnostiku



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Οριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός партиδας (Партида) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Numār lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (лот) / Топтама коды / Lot (kod)



Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder tilstrekkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contémo suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Conține suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Достаточно для <n> тестов(а) / <n> тесттери үшін жеткілікті / Sadržaj za (n) testova



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland

Difco and Bacto are trademarks of Difco Laboratories, a subsidiary of Becton, Dickinson and Company.

BD and BD Logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2011 BD.