

**VIROTECH Bordetella pertussis Toxin (PT) IgG ELISA
(B. pertussis PT IgG ELISA)**

Rendelési szám: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

Rendelési szám: EN215Q60

**VIROTECH Bordetella pertussis Toxin (PT) IgA ELISA
(B. pertussis PT IgA ELISA)**

Rendelési szám: EC215A00

Színkód:

IgG: ezüst/sötétkék

IgA: ezüst/fekete

CSAK *IN VITRO* DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Tartalom

1. Alkalmazás célja.....	3
2. A teszt működési elve	3
3. A készlet tartalma.....	3
3.1 IgG teszt készlet	3
3.2 IgG kvantifikáló készlet	3
3.3 IgA teszt készlet.....	3
4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések és biztonsági előírások	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)	4
7. A vizsgálat elvégzése	4
7.1 Vizsgálati anyag.....	4
7.2 A reagensek előkészítése	5
7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése.....	5
7.4 ELISA-processzor alkalmazása.....	5
8. Kvantitatív és szemikvantitatív tesztkiértékelés	5
8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése.....	6
8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása.....	6
8.3 IgG kiértékelési táblázat	6
8.4 IgA iértékelési séma.....	6
8.5 A teszt határai	7
9. Kvantitatív IgG tesztkiértékelés IU/ml-ben	7
9.1 Tesztfunkciókontroll	7
9.2 A kvantitatív eredmények kiszámítása milliliterenkénti nemzetközi egységben (IU/ml)	8
9.3 IgG interpretációs séma	8
10. Irodalom	9
11. A vizsgálat folyamatábrája vázlata.....	10

1. Alkalmazás célja

A pertussis toxin ELISA IgG- vagy IgA-antitestek humán szérumból történő szemikvantitatív és minőségi kimutatását teszi lehetővé. Akut vagy a közelmúltban lezajlott fertőzés, illetve az oltás következtében termelt antitestek kimutatására (az oltás hatékonyságának ellenőrzésére) szolgál. A továbbiakban IgG-ben lehetséges a mennyiség megadása milliliterenkénti nemzetközi egységben (IU/ml), a külön kapható IgG kvantifikáló készlet (EN215Q60) használatával.

2. A teszt működési elve

A humán szérumból kimutatandó antitest immunkomplexet alkot a mikrotiter lemezre rögzített antigénnel. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás eltávolítja. Az említett immunkomplexhez kötődik az enzimkonjugátum. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás ismét eltávolítja. A szubsztrátoldat (TMB) hozzáadása után az enzim (peroxidáz) aktivitása egy kék színyanyagot képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színűre változik.

3. A készlet tartalma

3.1 IgG teszt készlet

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető lyukból (reakcióedényből) áll (liofilizált).
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgG negatív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
5. **IgG kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgG pozitív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgG-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, Tris pufferben, felhasználásra kész
8. **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'TMB), 11ml**, felhasználásra kész
9. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeveréket tartalmaz

3.2 IgG kvantifikáló készlet

1. **IgG kalibráláskontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, használatra kész
2. **IgG gyengén reaktív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, használatra kész
3. **IgG erősen reaktív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, használatra kész

3.3 IgA teszt készlet

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető lyukból (reakcióedényből) áll (liofilizált).
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgA negatív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
5. **IgA kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgA pozitív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgA-konjugátum 2 (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerrel, Tris pufferben, felhasználásra kész
8. **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'TMB), 11ml**, felhasználásra kész
9. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeveréket tartalmaz

4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága

A teszt készletet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzés tanúsítványt.

1. A szükséges lyukak felhasználása után a fennmaradó lyukakat / csíkokat zárt tasakban, 2-8°C-on, nedvszívó anyaggal együtt kell tárolni. A reageneket használat után további tárolásra azonnal 2-8°C-ra kell tenni.
2. A felhasználásra kész konjugátum és a TMB oldat fényérzékeny és így ezeket sötétben kell tárolni. Ha a szubsztrátoldatot fény éri és ennek következtében elszíneződik, a továbbiakban nem használható fel. ki kell dobni.

3. Csak az elvégzendő teszthez szükséges mennyiségű felhasználásra kész konjugátumot illetve TMB-t vegye ki az üvegekből. A feleslegben kivett konjugátumot illetve TMB-t ki kell önteni, az üvegekbe azokat visszatölteni nem szabad.

Anyag	Állapot	Tárolás	Tartósság
Vizsgálati minták	Hígított	+2 és +8°C között	max. 6 óra
	Hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mikrotiterlemez	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban szárítószer tasakkal)	3 hónap
Reumafaktor – abszorbens	Hígítatlan, felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Hígított	+2 és +8°C között	1 hét
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Tetrametil-benzidin (TMB)	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Leállítóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Véghígított (Használatra kész)	+2 és +25°C között	4 hét

5. Óvintézkedések és biztonsági előírások

1. Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és mikrotiter csík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
2. A tartósítószer tartalmazó komponensek, a citrát fixáló (stop) oldat és a TMB irritálják a bőrt, a szemet és a nyálkahártyát. Az érintett testrészt folyó vízzel azonnal le kell mosni, és szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
3. A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

1. Desztillált / ioncserélt víz
2. Nyolccsatornás pipetta, 50 µl és 100 µl
3. Mikropipetták: 10 µl, 100 µl és 1000 µl
4. Vegyszerüvegek
5. Papírkendők és itatóspapír
6. Fedő az ELISA lemezekhez
7. Hulladéktároló a fertőző anyagok számára
8. ELISA kézi- ill. automata mosó mikrotiter lemezekhez
9. Spektrofotométer ELISA lemezekhez , hullámhossz 450 nm, referencia hullámhossz: 620 nm (referenciahullám hossza 620-690nm).
10. Inkubátorszekrény

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által előírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

7.1 Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

A pácienshígításokat mindig frissen kell elkészíteni.

Hosszabb tároláshoz a szérumokat le kell fagyasztani. A többszöri felolvasztást kerülni kell.

1. Csak friss, nem inaktivált szérumot szabad felhasználni.
2. Hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőzött mintákat, valamint zavaros szérumokat nem szabad felhasználni (hamis pozitív illetve negatív eredmények).

7.2 A reagensek előkészítése

A VIROTECH Diagnostics System Diagnostik nagyfokú rugalmasságot kínál azért, hogy a hígító- és mosópufferek, a TMB és a citrát fixáló (stop) oldat valamint a konjugátum különböző paraméterek mellett és eltérő gyártási tételek esetén is alkalmazhatóak. A felhasználásra kész kontrollok paraméterfüggetlenek és kizárólag a minőségi tanúsítványban megadott lemez charge-zsal együtt alkalmazhatók.

1. Állítsa be az inkubátorszekrény hőmérsékletét 37°C-ra és az inkubáció megkezdése előtt bizonyosodjon meg róla, hogy az elérte a beállított hőmérsékletet.
2. Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztcsíkokat tartalmazó csomagot.
3. Minden folyékony komponenst jól rázzon fel használat előtt.
4. A mosóoldat-koncentrátumot 1 l-re fel kell tölteni desztillált vagy demineralizált vízzel (ha a koncentrátumban esetleg kristályképződés látható, kérjük az oldatot hígítás előtt szobahőmérsékletre melegíteni, és használat előtt jól felrázni).
5. **Helyes Pertussis Toxin IgA meghatározáshoz szükséges a szérumokat az RF-SorboTech (VIROTECH-adszorpcióközeg) alkalmazásával előkezeltetni.** IgA-kontrolloknál kiesik az előadszorpció.

7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

1. Tesztételenként pipetázzon 100µl-t az alábbiakból: használatra kész hígítópuffer (vakérték), kontrollok és hígított páciensszérumok. Javasolunk mindenkor egy dupla tételt (vakérték, kontrollok és páciensszérumok); határérték- és kalibráláskontroll esetén a dupla tétel feltétlenül szükséges. A páciensszérumok munkahígítása: 1+100; pl. 10µl szérum + 1ml hígítópuffer.
2. A reagensek kipipetázása után 30 perc 37°C-on történő inkubáció következik (fedő alatt).
3. Az inkubációs idő lejártá után mossa ki a lyukakat 4-szer 350-400 µl mosóoldattal (lyukanként). Mosóoldatot ne hagyja lyukakban állni. Papírtörölközőre csepegtesse ki a maradék oldatot.
4. Minden lyukba pipetázzon 100 µl felhasználásra kész konjugátumot.
5. Inkubálja a konjugátumot 30 percig 37°C-on (fedő alatt).
6. A konjugátum inkubálását 4-szeri mosással állítsa le. (ld. 3.pont).
7. Pipetázzon 100 µl felhasználásra kész TMB szubsztrátoldatot minden lyukba.
8. A hordozóoldat inkubációja: 30 perc 37°C-on (lefedve, sötét helyen).
9. Minden lyukba pipetázzon 50 µl citrát fixáló (stop) oldatot, így leállítva a szubsztrátreakciót. Óvatosan kevertesse a lemezt, amíg a folyadékok teljesen összekeverednek és egy egységes sárga szín láthatóvá válik.
10. Mérjen extinkciót 450/620 nm-en (referenciahullám hossza 620-690nm). Állítsa úgy be a fotométert, hogy a mért vak érték a többi extinkciós értékből levonásra kerüljön (nullázza a fotométert az üres értékre). A fotometriás mérést a fixáló (stop) oldat hozzáadása után egy órán belül el kell végezni.

A vizsgálat folyamatábráját ld. az utolsó oldalon

7.4 ELISA-processzor alkalmazása

Valamennyi VIROTECH Diagnostics ELISA termék alkalmas ELISA processzorokkal való használatra. A felhasználó köteles a műszer érvényesítését rendszeresen elvégeztetni.

A VIROTECH Diagnostics a következő eljárást javasolja:

1. Az ELISA processzor üzembehelyezése ill. nagyobb javítása esetén javasoljuk, hogy végeztesse el a készülék hitelesítését a gyártó előírásai szerint.
2. Javasoljuk, hogy az ELISA processzort ellenőrizze a hitelesítő kit (EC250.00) segítségével is. A hitelesítő kittel történő ellenőrzést legalább negyedévenként ajánlott elvégezni.
3. Minden mérési sorozat során meg kell felelni a termék minőségi tanúsítványában szereplő minőségellenőrzési kritériumoknak.

Ez az eljárás mód biztosítja az ELISA processzor kifogástalan működését, és ezen túl a labor minőségbiztosítását is szolgálja.

8. Kvantitatív és szemikvantitatív tesztkiértékelés

A felhasználásra kész kontrollok a specifikus IgG- és IgA-antitestek koncentrációjának VIROTECH egységekben (=VE) történő szemikvantitatív meghatározására szolgálnak. A teszt végrehajtása során előforduló ingadozásokat a számítási módszer kiegyenlíti, ezáltal nagyfokú reprodukálhatóságot érve el. A VE kiszámításához az OD-értékek átlagát kell használni.

8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése

a) OD-értékek

Az üres minta OD-értéke <0,15 kell, hogy legyen.

A negatív kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek alatt, míg a pozitív kontrollok és a cut-off kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek felett kell lenniük.

b) VIROTECH egységek (VE)

A cut-off kontrollok VIROTECH egységeiben (VE) megadott értéke 10 VE-ben van meghatározva. A pozitív kontrollok VE-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott értéktartományon belül kell lenniük.

Amennyiben a fenti feltételek (OD-értékek, VE értékek) nem teljesülnek, a tesztet meg kell ismételni.

8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása

A vak minta extinkcióját (450/620 nm) minden extinkcióból ki kell vonni.

$$\text{VE}_{\text{(pozitív kontrollok)}} = \frac{\text{OD}_{\text{(pozitív kontroll)}}}{\text{OD}_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$
$$\text{VE}_{\text{(betegszérum)}} = \frac{\text{OD}_{\text{(betegszérum)}}}{\text{OD}_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$

8.3 IgG kiértékelési táblázat

A Pertussis Toxin IgG ELISA-k VIROTECH egységeinek (VE) kalibrálása a WHO nemzetközi szabvánnyal történik. Ebből adódik a kiértékelésben megadott korreláció a VIROTECH egységben (VE) és nemzetközi egységben kifejezett IgG között (7).

IU/ml (WHO)	VE	IgG- Antitest	Interpretáció
	< 9	negatív	$\Rightarrow$ nincs megnövekedett antitest-titer a pertussis-toxin ellen Az eredmény nem utal <i>B. pertussis</i> fertőzésre Klinikai tünetegyüttes esetén kérje a folyamat ellenőrzését vagy alkalmazzon differenciáldiagnosztikát az ellentmondás tisztázására.
36-44	9 – 11	határérték	$\Rightarrow$ megnövekedett antitest-titer a pertussis-toxin ellen - egy visszamaradó fertőzéből származó perzisztens antitest - egy kezdődő immunválasz antitestjei - Oltás ellen termelt antitestek
	> 11	pozitív	$\Rightarrow$ szignifikánsan megnövekedett antitest-titer a pertussis-toxin ellen - egy friss, vagy a közelmúltban bekövetkezett fertőzésre utaló jel - Oltás ellen termelt antitestek általi immunfelismerés a beteg által kapott oltásokat feltétlenül vegye figyelembe, mivel a teszt nem tud különbséget tenni az oltás és egy fertőzés ellen termelt antitestek között
≥ 100	≥ 17	fertőzés	$\Rightarrow$ szignifikánsan megnövekedett antitest-titer a pertussis-toxin ellen, mely akut fertőzésre utal, amennyiben az utolsó oltás óta több mint 12 hónap telt el

8.4 IgA iértékelési séma

A Pertussis Toxin IgA ELISA a WHO nemzetközi szabványetalonnal lesz összehasonlítva. Ebből adódik a kiértékelésben megadott korreláció a VIROTECH egységben (VE) és a milliliterenkénti nemzetközi egységben (IU/ml) kifejezett IgA között (11, 12).

IU/ml (WHO)	VE	IgA- antitest	Interpretáció
----------------	----	---------------	---------------

< 12 IU/ml	< 9	negatív	⇒ <i>nincs megnövekedett Ak-titer a Pertussis-Toxinnal szemben:</i> nem áll fenn <i>B. pertussis</i>-fertőzés gyanúja Klinikai tünetek fennállása esetén lefolyáskontroll szükséges vagy más diagnosztikával kell tisztázni
	9 – 11	határérték	⇒ <i>megnövekedett Ak-titer a Pertussis -Toxinnal szemben:</i> - korábbi fertőzéstől származó perzisztens Ak - kezdődő immunválasz Ak-ja - Oltási antitest
≥ 12 IU/ml	> 11	pozitív	⇒ <i>jelentősen megnövekedett Pertussis-Toxinnal szembeni Ak-titer:</i> További pozitív IgG-Ak-titer (> 11 VE): - Utalás friss vagy nemrég lezajlott fertőzésre - Oltási antitestek felismerése: Az oltásnyilvántartást feltétlenül figyelembe kell venni, mivel a teszt nem tud különbséget tenni az oltásból vagy fertőzéstől származó antitestek között További negatív/ határérték IgG-Ak-titer (≤ 11 VE): - Lefolyáskontroll szükséges.

Figyelmeztetés: IgA-antitestek nem mindig képződnek, ezért valamivel kevésbé megbízható markerei a *Bordetella pertussis* fertőzésnek, mint az IgG-antitestek.

- A beteg által kapott oltásokat feltétlenül vegye figyelembe, mivel a teszt nem tud különbséget tenni az oltás és egy fertőzés ellen termelt antitestek között
- Amennyiben a minta mért VE értéke a határérték felett van, a mintát pozitívnak kell tekinteni.
- Ha a mért VE értékek a megadott határérték tartományba esnek, az antitestek koncentrációja nem számottevő és a mintát határértéken levőnek kell tekinteni. A fertőzés biztos kimutatásához két szérummintából szükséges az antitestet kimutatni. Egy szérummintát közvetlenül a fertőzés kezdete után, egyet pedig 5-10 nappal később (rekonvaleszcens szérum) kell tesztelni. Az antitest-koncentrációt párhuzamosan, egyetlen teszt mérés során kell meghatározni mindkét mintából. Egyetlen szérumminta eredményei alapján korrekt diagnózis nem állítható fel.
- Ha a mért értékek a meghatározott határérték alá esnek, a mintából nem mutatható ki antigénspecifikus antitest. A mintát negatívnak kell tekinteni.
- Ha az IgA eredmény a határértéken van és az IgG eredmény <17 VE, annak tisztázására, hogy akut infekció áll-e fenn, egy második szérumminta analízise szükséges.

8.5 A teszt határai

- A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.

9. Kvantitatív IgG tesztkiértékelés IU/ml-ben

A használatra kész kalibráláskontroll külön kapható az IgG kvantifikáló készlettel (EN215Q60) együtt és rendeltetése az anti-PT IgG antitestek kvantitatív meghatározása a páciensszérumban. A kalibráláskontroll kiegyenlíti a tesztkivitelezés miatti ingadozásokat. A számításhoz az optikai sűrűség (OD, optical density) középértéke kerül használatra.

9.1 Tesztfunkciókontroll

a) OD-érték

A vakérték OD-értéke <0,15 kell legyen.

A kalibráláskontroll OD-értéke a hozzátartozó bizonyítványban megadott tartományban kell legyen.

b) IU/ml

A gyengén reaktív kontroll és az erősen reaktív kontroll anti-PT IgG-koncentrációja (IU/ml) a minőség-ellenőrzési bizonyítványban megadott tartományon belül kell legyen.

Ha ezek a követelmények (OD-értékek, IU/ml) nem teljesülnek, akkor a tesztet meg kell ismételni.

9.2 A kvantitatív eredmények kiszámítása milliliterenkénti nemzetközi egységben (IU/ml)

A vakérték kioltását (450/620 nm) le kell vonni az összes kioltásból.

A betegszérumok kvantitatív értékelése a VIROTECH IgG kvantifikáló készlettel a WHO nemzetközi szabvánnyal való korreláció alapján történik. Nem lineáris regressziót használva, átfogó teszteléssel minden lemezadaghoz meghatározásra kerül az alábbi matematikai képlettel (14) leírható standardgörbe:

$$IU/ml = \exp(-(\ln((D-A)/((OD \text{ korr})-A)-1)-B)/C)$$

ahol

- A: 0 anti-PT IgG koncentráció mellett várható OD
B: meredekség
C: inflexiós pont
D: végtelen magas anti-PT IgG koncentráció mellett várható OD
OD korr: páciensszérum korrigált OD-értéke

A tesztfeldolgozás során bekövetkező ingadozások figyelembe vétele céljából megtörténik a páciensszérum mért OD-értékének korrigálása kalibráláskontroll segítségével:

$$OD_{\text{korr}} = OD_{\text{Páciensszérum}} * \frac{OD_{\text{Előírt kalibráláskontroll}}}{OD_{\text{Mért kalibráláskontroll}}}$$

Az A, B, C és D paraméterek értékeit, valamint a kalibráláskontroll előírt OD-értékét a bizonyítványból kell átvenni.

Meghatározás IU/ml-ben

Az IU/ml meghatározása a VIROTECH-től beszerezhető szoftverrel történik. Alternatív megoldásként gyors táblázatos számításhoz szükséges kiértékelési módszer is rendelkezésre bocsátható.

A VIROTECH Pertussis Toxin IgG kvantifikáló készlettel való kvantifikálás esetén a határértéktartomány definíció szerint ≥ 40 IU/ml és < 100 IU/ml között van, ami ≥ 10 VE és < 17 VE közötti VE-tartományoknak felel meg.

A kvantifikálható tartomány 5 IU/ml és 500 IU/ml között van.

9.3 IgG interpretációs séma

A Pertussis Toxin IgG ELISA-k nemzetközi egységeinek (IU/ml) kalibrálása a WHO nemzetközi etalonnal történt. Az interpretáció megfelel az európai referenciaközpontok ajánlásainak (7, 11, 12, 13, 15).

IU/ml (WHO)	Interpretáció
< 40	Nincs bizonyíték kórokozókontaktusra a közelmúltban
≥ 40 és < 100	Kérdéses eredmény. Lefolyáskontroll szükséges, vagy IgA-anti-PT meghatározása: - IgA-anti-PT ≤ 11 VE (megfelel < 12 IU/ml értéknek): Nincs bizonyíték kórokozókontaktusra a közelmúltban. - IgA-anti-PT > 11 VE (megfelel ≥ 12 IU/ml értéknek): Bizonyíték kórokozókontaktusra a közelmúltban, feltéve, hogy az utolsó oltás 12 hónapnál régebben történt – oltásnyilvántartást figyelembe kell venni!
≥ 100	Bizonyíték kórokozókontaktusra a közelmúltban, feltéve, hogy az utolsó oltás 12 hónapnál régebben történt – oltásnyilvántartást figyelembe kell venni!

10. Irodalom

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springerverlag 1991, p361 - 363
2. Wiersbitzky, Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt, 1995, Therapiewoche 25, p1485-1486
3. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Brandis, Köhler, Eggers, Pulverer, 7. Auflage, p483
4. Mastrantonio et al., *Bordetella parapertussis* infections, 1997, Dev Biol Stand, 89, p255-259
5. Mastrantonio et al., Antibody kinetics and long-term sero-prevalence in the Italian clinical trial of acellular pertussis vaccines, 1997, Dev Biol Stand, 89, p275-278
6. Wirsing von König et al., Evaluation of a single-Sample Serological Technique for Diagnosing Pertussis in Unvaccinated Children, 1999, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 18, p341-345
7. De Melker et al., Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*, 2000, J Clin Microbiol, 38, p800-806
8. Swidsinski, Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, April 1997
9. Meade et al., Serodiagnosis of Pertussis, 1994, Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.
10. Meijer, Numerical Comparison of 4 Pertussis Toxin IgG-ELISAs, 2002, nicht publiziert, Krankenhaus Groningen, NL
11. Riffelmann et al., Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis*, 2010, J Clin Microbiol, 48, p4459-4463
12. Guiso et al., What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories, 2010, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, DOI 10.1007/s10096-010-1104-y
13. RKI Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte: Pertussis (Keuchhusten), 03.09.2010
14. Plikaytis et al., Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate *Neisseria meningitidis* Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 1991, J Clin Microbiol, 29, p1439-1446
15. Podbielski et al., MiQ 13/2010, Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ), Teil II (Heft 13b), Bakterielle Erreger: *Bordetella pertussis*, 2. Auflage, p98-106

A betegminták és a mosóoldat előkészítése

▼ **Mosóoldat:** A koncentrátumot hígítsa fel 1 literre desztillált vagy ioncserélt vízzel.

IgG- minták – hígítás 1:101

pl.:

10 µl szérum/plazma + 1000 µl hígítópuffer.
(a szérum hígítópuffer felhasználásra kész)

IgA- minták – hígítás 1:100

Reumafaktor-abszorpció RF-SorboTech-hel

pl.:

5 µl szérum/plazma + 450 µl hígítópuffer +
1 csepp RF-SorboTech, 15 perc inkubáció
szobahőmérsékleten

A vizsgálat elvégzése

Mintainkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl betegszérum

Üres minta (hígítópuffer) és kontrollok



4x mosás

400 µl mosóoldat

jól kiütögetni



Konjugátum inkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl konjugátum

IgG, IgA



4x mosás

400 µl mosóoldat

jól kiütögetni



Szubsztrátinkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl szubsztrát



Leállítás

50 µl fixáló (stop) oldat

óvatosan kevertetni



Extinkció mérés

Fotométer 450/620 nm-en
(referenciahullám hossza 620-
690nm)