

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

Užsakymo Nr.: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

Užsakymo Nr.: EN215Q60

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

Užsakymo Nr.: EC215A00

Spalvinis kodas:

IgG: sidabrinė / tamsiai mėlyna

IgA: sidabrinė / juoda

TIK IN VITRO DIAGNOSTIKAI

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

Tel.: +49(0)6074-23698-0

Fax.: +49(0)6074-23698-900

www.goldstandarddiagnostics.com



Turinys

1. Paskirtis	3
2. Testo veikimo principas	3
3. Pakuotės turinys	3
4. Testavimo rinkinio ir paruoštų naudoti reagentų laikymas ir tinkamumo laikas	4
5. Atsargumo priemonės ir įspėjimai	4
6. Reikalingos papildomos medžiagos (neįeina į tiekimo komplektą)	4
7. Testo eiga	5
7.1 Tiriama medžiaga	5
7.2 Reagentų paruošimas	5
7.3 „VIROTECH“ ELISA testo eiga	5
7.4 ELISA procesorių naudojimas	5
8. Kokybinis ir pusiau kiekybinis testo vertinimas	6
8.1 Testo funkcionalumo kontrolė:	6
8.2 „VIROTECH“ vienetų (VE) apskaičiavimas	6
8.3 IgG vertinimo schema	6
8.4 IgA vertinimo schema	7
8.5 Testo ribos	7
9. Kiekybinis IgG testo vertinimas IU/ml	8
9.1 Testo veikimo kontrolė	8
9.2 Kiekybinių rezultatų apskaičiavimas tarptautiniais vienetais mililitre (IU/ml)	8
9.3 IgG interpretavimo schema	8
10. Literatūra	9
11. Testo eigos schema	10

1. Paskirtis

Kokliušo toksino ELISA pusiau kiekybiškai ir kokybiškai patvirtina IgG arba IgA antikūnų buvimą žmogaus serume.

Jis naudojamas ūmiai infekcijai arba neseniai persirgtai infekcijai patvirtinti ar antikūnams po skiepų aptikti (vakcinacijos sėkmės kontrolė). Be to, naudojantis atskirai įsigyjamais IgG kiekybinio vertinimo rinkiniais (EN215Q60), galima kiekybiškai įvertinti IgG tarptautiniais vienetais mililitre (IU/ml).

2. Testo veikimo principas

Žmogaus serume ieškomasis antikūnas sudaro imuninį kompleksą su antigenu, fiksuotu ant mikrotitrų plokštelės. Plovimo metu išplaunami nesurišti imunoglobulinai. Su šiuo kompleksu po to jungiasi konjuguoti fermentai. Nesurišti imunoglobulinai vėl išplaunami plovimo metu. Pridėjus substrato tirpalo (TMB), dėl fermentų (peroksidazės) aktyvumo susidaro mėlynas dažiklis, kuris, pridėjus fiksuojamojo tirpalo, pagelsta.

3. Pakuotės turinys

4.1 IgG testavimo rinkinys

1. **1 mikrotitrų plokštelė**, sudaryta iš 96 antigenų dengtų, nulaužiamų atskirų šulinėlių, liofilizuota
2. **PBS skiedimo buferis, (mėlynas, paruoštas naudoti), 2x50 ml**, pH 7,2, su konservantu ir „Tween 20“
3. **PBS ploviklis (20x koncentruotas), 50 ml**, pH 7,2, su konservantu ir „Tween 20“
4. **IgG neigiama kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
5. **IgG ribinių verčių kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
6. **IgG teigiama kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
7. **IgG konjugatas (prieš žmogų), 11 ml**, (avies arba ožkos) krienų peroksidazės konjugatas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu „Tris“ buferyje, paruoštas naudoti
8. **Tetrametilbenzidino substrato tirpalas (3,3',5,5'TMB), 11 ml**, paruoštas naudoti
9. **Citratinis fiksavimo tirpalas, 6 ml**, su rūgščių mišiniu

4.2 IgG kiekybinio vertinimo rinkinys

1. **IgG kalibravimo kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
2. **IgG silpnai reaguojanti kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
3. **IgG stipriai reaguojanti kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti

4.3 IgA testavimo rinkinys

1. **1 mikrotitrų plokštelė**, sudaryta iš 96 antigenų dengtų, nulaužiamų atskirų šulinėlių, liofilizuota
2. **PBS skiedimo buferis, (mėlynas, paruoštas naudoti), 2x50 ml**, pH 7,2, su konservantu ir „Tween 20“
3. **PBS ploviklis (20x koncentruotas), 50 ml**, pH 7,2, su konservantu ir „Tween 20“
4. **IgA neigiama kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
5. **IgA ribinių verčių kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
6. **IgA teigiama kontrolinė medžiaga, 2000 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti
7. **IgA konjugatas 2 (prieš žmogų), 11 ml**, (avies arba ožkos) krienų peroksidazės konjugatas su FCS ir konservantu „Tris“ buferyje, paruoštas naudoti
8. **Tetrametilbenzidino substrato tirpalas (3,3',5,5'TMB), 11 ml**, paruoštas naudoti
9. **Citratinis fiksavimo tirpalas, 6 ml**, su rūgščių mišiniu

4. Testavimo rinkinio ir paruoštų naudoti reagentų laikymas ir tinkamumo laikas

Laikykite testavimo rinkinį 2–8 °C temperatūroje. Atskirų komponentų tinkamumo laikas nurodytas atitinkamose etiketėse; rinkinio tinkamumo laiką žr. kokybės kontrolės sertifikate.

1. Paėmę reikiamą kiekį šulinėlių, likusius šulinėlius/juosteles laikykite uždareme maišelyje su sausikliu 2–8 °C temperatūroje. Reagentus iškart po naudojimo laikykite 2–8 °C temperatūroje.
2. Paruoštas naudoti konjugatas ir TMB substrato tirpalas jautrūs šviesai ir turi būti laikomi tamsioje vietoje. Jeigu dėl šviesos poveikio pakinta substrato tirpalo spalva, jis naudojimui nebetinka.
3. Imkite tik testų serijai reikalingą paruošto naudoti konjugato arba TMB kiekį. Jeigu paėmėte per daug konjugato arba TMB, pertekliaus atgal supilti negalima, jį reikia išpilti.

Medžiaga	Būsena	Laikymas	Stabilumas
Tiriamieji mėginiai	Praskiesti	nuo +2 iki +8 °C	maks. 6 h
	Nepraskiesti	nuo +2 iki +8 °C	1 savaitė
Kontrolės medžiagos	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
Mikrotitrų plokštelė	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (laikant kartu tiekiamame maišelyje su sausiklio maišeliu)	3 mėnesiai
Reumatoidinių faktorių absorbentas	Nepraskiesti, Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
	Praskiestas	nuo +2 iki +8 °C	1 savaitė
Konjugatas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (nuo šviesos apsaugotoje vietoje)	3 mėnesiai
Tetrametilbenzidinas (TMB)	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (nuo šviesos apsaugotoje vietoje)	3 mėnesiai
Stabdantis tirpalas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
Plovimo tirpalas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
	Praskiestas iki reikiamos koncentracijos (paruoštas naudoti)	nuo +2 iki +25 °C	4 savaitės

5. Atsargumo priemonės ir įspėjimai

1. Kontrolinėms medžiagoms naudojamas serumas yra ištirtas ir nustatyta, kad jis yra neigiamas ŽIV1-AK, ŽIV2-AK, HCV-AK ir hepatito B paviršinio antigenui, tačiau visus mėginius, atskiestus mėginius, kontrolines medžiagas, konjugatus ir mikrotitrų juosteles reikia laikyti potencialiai užkrečiamos medžiagomis ir dirbant su jomis imtis atitinkamų atsargumo priemonių. Laikykites atitinkamų laboratorijos darbo taisyklių.
2. Komponentai, kuriuose yra konservanto, citratinio fiksavimo tirpalo ir TMB, dirgina odą, akis ir gleivines. Sąlyčio su šiomis kūno dalimis atveju nedelsiant nuplauti tekančiu vandeniu ir, jeigu reikia, kreiptis medicininės pagalbos.
3. Naudotas medžiagas utilizuokite vadovaudamiesi atitinkamais šalies teisės aktais.

6. Reikalingos papildomos medžiagos (neįeina į tiekimo komplektą)

1. Distiliuotas ir demineralizuotas vanduo;
2. Daugiakanalė pipetė: 50 µl, 100 µl;
3. Mikropipetės: 10 µl, 100 µl, 1000 µl;
4. Reagentų buteliukai;
5. Celiulioziniai rankšluosčiai;
6. Dangtis ELISA plokštelėms;
7. Biologiškai pavojingų atliekų konteineris;
8. ELISA rankinis arba automatinis mikrotitrų plokštelių plautuvas;
9. Mikrotitrų plokštelių spektrofotometras su 450/620 nm filtru (referencinis bangų ilgis 620–690 nm);
10. Inkubatorius.

7. Testo eiga

Kad gautumėte teisingus rezultatus, būtinai laikykitės bendrovės „VIROTECH Diagnostics“ darbo proceso nurodymų.

7.1 Tiriamoji medžiaga

Tyrimui galima naudoti serumą ir plazmą (šiuo atveju antikoagulantų rūšis reikšmės neturi), nors šiame pakuotės lapelyje nurodytas tik serumas.

Pacientų mėginių skiedinius visada paruoškite šviežiai.

Serumo mėginius, kuriuos reikia laikyti ilgiau, užšaldykite. Negalima kelis kartus atitirpinti užšaldytų mėginių.

1. Naudokite tik šviežius, neišaktyvintus serumo mėginius.
2. Nenaudokite hiperlipeminių, hemolizinių, mikrobiologiškai užterštų mėginių ir drumsto serumo (galima gauti klaidingai teigiamus arba klaidingai neigiamus rezultatų).

7.2 Reagentų paruošimas

„VIROTECH Diagnostics“ sisteminės diagnostikos priemonės galima naudoti labai lanksčiai, nes skiedimo ir plovimo buferius, TMB, citratinį fiksavimo tirpalą bei konjugatą galima naudoti neatsižvelgiant į parametrus ir partijas. Paruoštų naudoti kontrolinių medžiagų parametrai yra specifiniai ir jas galima naudoti tik kartu su kokybės kontrolės sertifikate nurodyta plokštelių partija.

1. Inkubatoriuje nustatykite 37 °C temperatūrą ir prieš pradėdami inkubuoti patikrinkite, ar ši temperatūra jau pasiekta.
2. Visus reagentus palaikykite kambario temperatūroje, tik po to atidarykite pakuotę su diagnostinėmis juostelėmis.
3. Visus skystus komponentus prieš naudojimą gerai pakratykite.
4. Plovimo tirpalo koncentratą iki 1 litro papildykite distiliuotu (dejonizuotu) vandeniu (jeigu koncentrate yra susidariusių kristalų, prieš skieddami atšildykite jį iki kambario temperatūros ir prieš vartojimą gerai suplakite).
5. **Siekiant tinkamai nustatyti kokliušo toksino IgA koncentraciją būtina iš anksto apdoroti serumus „RF SorboTech“** (VIROTECH adsorbentu). IgA kontroliniams mėginiams išankstinė adsorbcija nereikalinga.

7.3 „VIROTECH“ ELISA testo eiga

1. Kiekvienam testavimo ciklui pipete įlašinkite 100 µl paruošto naudoti skiedimo buferio (neutralioji vertė), kontrolinių medžiagų ir atskiestų paciento serumų. Mes rekomenduojame dvigubą ciklą (neutraliosios vertės, kontrolių ir paciento serumų); ribinėms vertėms ir kalibravimo kontrolei dvigubas ciklas būtinas. Darbinis paciento serumų skiedimas: 1+100; pvz., 10 µl serumo + 1 ml skiedimo buferio.
2. Pipete įlašinus medžiagas, jos 30 minučių inkubuojamos 37 °C temperatūroje (uždengus).
3. Inkubavimo periodas baigiamas atliekant 4 plovimo ciklus, kiekvienam šulinėliui išplauti naudojant po 350–400 µl ploviklio. Nepalikite ploviklio šulinėliuose; skysčio likučiams pašalinti apverskite plokštelę ant celiuliozinio rankšluosčio ir pabelskite dugną.
4. Pipete į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 µl paruošto naudoti konjugato.
5. Konjugatų inkubacija: 30 min. 37 °C temperatūroje (uždengus).
6. Inkubavimo periodas baigiamas atliekant 4 plovimo ciklus (žr. 3 punktą).
7. Pipete į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 µl paruošto naudoti TMB substrato tirpalo.
8. Substrato tirpalo inkubacijos trukmė: 30 min. 37 °C temperatūroje (uždengus, tamsioje vietoje).
9. Reakcijos su substratu fiksavimas: pipete į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 50 µl citratinio fiksavimo tirpalo. Atsargiai ir atidžiai papurtykite plokštelę, kad gerai susimaišytų visi skysčiai ir matytumėte vientisą geltoną spalvą.
10. Ekstinkcijas išmatuokite per 450/620 nm filtrą (referencinis bangų ilgis 620–690 nm). Nustatykite fotometrą, kad iš visų kitų ekstinkcijų būtų atimama išmatuota neutralioji vertė. Fotometrinį matavimą reikia atlikti per vieną valandą po fiksuojamojo tirpalo pridėjimo.

Testo eigos schemą žr. paskutiniame psl.

7.4 ELISA procesorių naudojimas

Visus „VIROTECH Diagnostics“ ELISA tyrimus galima apdoroti ELISA procesoriais. Naudotojas įsipareigoja atlikti periodinį prietaisų kalibravimą.

Bendrovė „VIROTECH Diagnostics“ rekomenduoja atlikti šiuos veiksmus:

1. Ilgesnį laiką nenaudojant ELISA procesoriaus arba po didesnio remonto, bendrovė „VIROTECH Diagnostics“ rekomenduoja sukalibruoti prietaisą pagal prietaiso gamintojo nuorodas.

- Po to patartina ELISA procesorių patikrinti naudojant kalibravimo rinkinį (EC250.00). Tokią reguliarią patikrą su kalibravimo rinkiniu reikia atlikti ne rečiau nei vieną kartą per tris mėnesius.
- Kiekvieno testo metu turi būti įvykdyti preparato kokybės kontrolės sertifikate nurodyti leidimo naudoti kriterijai. Toks būdas užtikrina neprikaištingą Jūsų ELISA procesoriaus veikimą, o taip pat ir laiduoja laboratorijos darbo kokybę.

8. Kokybinis ir pusiau kiekybinis testo vertinimas

Paruoštos naudoti kontrolinės medžiagos skirtos pusiau kiekybiniam specifinių IgG ir IgA antikūnų nustatymui, koncentraciją pateikiant „VIROTECH“ vienetais (vok. VE). Testo eigoje atsiradę svyravimai kompensuojami matematiniu būdu ir užtikrinamas aukštas laipsnio atstatomumas. VE skaičiuojami pagal vidurinį OD verčių diapazoną.

8.1 Testo funkcionalumo kontrolė:

a) OD vertės

Neutraliosios vertės OD vertė turi būti < 0,15.

Neigiamų kontrolinių medžiagų OD vertės turi būti mažesnės už kokybės kontrolės sertifikate nurodytas OD vertes; teigiamų kontrolinių medžiagų ir slenkstinių verčių kontrolinių medžiagų OD vertės turi būti didesnės už kokybės kontrolės sertifikate nurodytas OD vertes.

b) „VIROTECH“ vienetai (VE)

Nustatoma 10 „VIROTECH“ vienetų (vok. VE) slenkstinių verčių kontrolinių medžiagų VE vertė. Apskaičiuota teigiamų kontrolinių medžiagų VE vertė turi būti kokybės kontrolės sertifikate nurodytame diapazone.

Jeigu reikalavimai neįvykdyti (OD verčių, VE), testą reikia pakartoti.

8.2 „VIROTECH“ vienetų (VE) apskaičiavimas

Iš visų ekstinkcijų reikia atimti neutralios vertės (450/620 nm) ekstinkciją.

$$VE_{\text{(teigiama kontrolė)}} = \frac{OD_{\text{(teigiama kontrolė)}}}{OD_{\text{(slenkstinių verčių kontrolė)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(pacientoserumas)}} = \frac{OD_{\text{(pacientoserumas)}}}{OD_{\text{(slenkstinių erčrė kkontrolė)}}} \times 10$$

8.3 IgG vertinimo schema

Tyrimo ELISA kokliušo toksino IgG „VIROTECH“ vienetai (VE) buvo kalibruoti pagal PSO tarptautinį standartą. Iš čia gaunamas vertinime nurodytas IgG sąryšis tarp „VIROTECH“ vienetų (VE) ir tarptautinių vienetų mililitre (IU/ml) (7).

IU/ml (PSO)	VE	IgG antikūnai	Interpretavimas
	< 9	neigiamas	⇒ <i>antikūnų titras kokliušo toksinui nepadidėjęs:</i> <i>B. pertussis</i> infekcija neįtariama. Jei pasireiškia klinikiniai simptomai, pareikalauti eigos kontrolės arba imtis kitų diagnozės priemonių.
36-44	9 – 11	ribinis	⇒ <i>padidėjęs antikūnų titras kokliušo toksinui:</i> - persistuojantys ankstesnės infekcijos antikūnai - prasidedančio imuninio atsako antikūnai - dėl skiepų susidarę antikūnai
	> 11	teigiamas	⇒ <i>ženkliai padidėjęs antikūnų titras kokliušo toksinui:</i> nuoroda į šviežią arba neseniai persirgtą infekciją

			dėl skiepų susidariusių antikūnų atpažinimas: būtina atkreipti dėmesį į skiepų statusą, kadangi šis testas nerodo skirtumo tarp dėl skiepų susidariusių antikūnų ir dėl infekcijos susidariusių antikūnų
≥ 100	≥ 17	infekcija	⇒ <i>ženkliai padidėjęs antikūnų titras kokliušo toksinui, reiškiantis ūmią infekciją, jeigu nuo paskutinio skiepavimo praėjo daugiau kaip 12 mėnesių</i>

8.4 IgA vertinimo schema

Tyrimo ELISA kokliušo toksinas IgG suderintas su PSO tarptautiniu standartu. Iš čia gaunamas vertinime nurodytas IgA sąryšis tarp „VIROTECH“ vienetų (VE) ir tarptautinių vienetų mililitre (IU/ml) (11, 12).

IU/ml (PSO)	VE	IgA antikūnai	Interpretavimas
< 12 IU/ml	< 9	neigiamas	⇒ <i>antikūnų titras kokliušo toksinui nepadidėjęs:</i> <i>B. pertussis</i> infekcija neįtariama. Jei pasireiškia klinikiniai simptomai, pareikalauti eigos kontrolės arba imtis kitų diagnozės priemonių.
	9 – 11	ribinis	⇒ <i>padidėjęs antikūnų titras kokliušo toksinui:</i> - persistuojantys ankstesnės infekcijos antikūnai - prasidedančio imuninio atsako antikūnai - dėl skiepų susidarę antikūnai
≥ 12 IU/ml	> 11	teigiamas	⇒ <i>ženkliai padidėjęs antikūnų titras kokliušo toksinui:</i> Jeigu prie to IgG antikūnų titras teigiamas (> 11 VE): - šviežios arba neseniai persirgtos infekcijos požymis - dėl skiepų susidariusių antikūnų atpažinimas: būtina atkreipti dėmesį į skiepų statusą, kadangi šis testas nerodo skirtumo tarp dėl skiepų susidariusių antikūnų ir dėl infekcijos susidariusių antikūnų Jeigu prie to IgG antikūnų titras neigiamas / ribinis (≤ 11 VE): - pareikalauti eigos kontrolės.

Nuoroda. IgA antikūnai sudaromi ne visada ir todėl jie yra ne toks patikimas *Bordetella pertussis* infekcijos žymuo kaip IgG antikūnai.

- Būtina atkreipti dėmesį į skiepų statusą, kadangi šis testas nerodo skirtumo tarp dėl skiepų susidariusių antikūnų ir dėl infekcijos susidariusių antikūnų.
- Jeigu išmatuota mėginio VE vertė didesnė nei ribinis diapazonas, mėginius reikia laikyti teigiamais.
- Jeigu išmatuota mėginio VE vertė yra nurodyto ribinio diapazono ribose, ženkliai didelės antikūnų koncentracijos nėra; mėginiai laikomi ribiniais. Patikimam infekcijos įrodymui antikūnų kiekį reikia nustatyti dviejuose serumo mėginiuose. Testuoti reikėtų vieną mėginį tuojau pat, tik prasidėjus infekcijai, o antrą mėginį po 5–10 dienų (rekonvalescentinis serumas). Abiejų mėginių antikūnų koncentraciją reikia nustatyti lygiagrečiai, t. y., vienu testavimo ciklu. Teisinga diagnozė iš vieno vienintelio serumo mėginio neįmanoma.
- Jeigu išmatuotos vertės mažesnės už apibrėžtą ribinį diapazoną, reiškia mėginyje galimų išmatuoti antigenui specifinių antikūnų nėra. Mėginiai laikomi neigiamais.
- Jeigu IgA rezultatas ribinis, o IgG rezultatas <17 VE, išsiaiškinimui, ar nėra ūmios infekcijos, reikalingas dar vienas serumo mėginy.

8.5 Testo ribos

- Interpretuojant serologinius rezultatus visada reikia atsižvelgti ir į bendrą klinikinį vaizdą, epidemiologinius duomenis ir, jei yra, kitų turimų laboratorinių tyrimų rezultatus.

9. Kiekybinis IgG testo vertinimas IU/ml

Paruoštą naudoti kalibravimo kontrolinę medžiagą galima įsigyti atskirai su IgG kiekybinio vertinimo rinkiniu (EN215Q60). Ji naudojama kiekybinei anti-PT IgG antikūnų analizei IU/ml vienetais paciento serume. Kalibravimo kontrolė kompensuoja testo atlikimo sąlygojamus svyravimus. Apskaičiavimui naudojami OD verčių vidurkiai.

9.1 Testo veikimo kontrolė

a) OD vertės

Neutraliosios vertės OD vertė turėtų būti $< 0,15$.

Kalibravimo kontrolės OD vertė turi būti jai priskirtame sertifikate nurodytame diapazone.

b) IU/ml

Silpnai reaguojančios kontrolės ir stipriai reaguojančios kontrolės anti-PT IgG koncentracija (IU/ml) turi būti kokybės kontrolės sertifikate nurodytuose diapazonuose.

Jeigu reikalavimai neišpildomi (OD verčių, IU/ml), testą reikia kartoti.

9.2 Kiekybinių rezultatų apskaičiavimas tarptautiniais vienetais mililitre (IU/ml)

Iš visų ekstinkcijų reikia atimti neutraliosios vertės (450/620 nm) ekstinkciją.

Pacientų serumo kiekybinis įvertinimas naudojant „VIROTECH“ IgG kiekybinio įvertinimo rinkinį, yra vykdomas koreliuojant su PSO tarptautiniu standartu. Didelės apimties testavimu kiekvienai plokštelių partijai pagal netiesinę regresiją nustatoma standartinė kreivė, apibrėžiama tokia formule (14):

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

Kur:

A: laukiamas OD, kai anti-PT IgG koncentracija lygi 0

B: krypties koeficientas

C: lūžio taškas

D: laukiamas OD, kai anti-PT IgG koncentracija begaliniai didelė

OD kor: koreguota paciento serumo OD

Svyravimų testavimo atlikime kompensavimui išmatuota paciento serumo OD koreguojama pagal kalibravimo kontrolę:

$$\text{OD kor.} = \text{OD}_{\text{paciento serumas}} * \frac{\text{OD kalibravimo kontrolė prisk.}}{\text{OD kalibravimo kontrolė išmat.}}$$

Parametrų A, B, C ir D vertės, kaip ir numatytoji kalibravimo kontrolės OD vertė, nurodytos sertifikate.

IU/ml nustatymas

IU/ml nustatyti galima programine įranga, kurią galima įsigyti iš „VIROTECH“. Vietoj to gali būti pateiktas ir populiariausioms kalkuliatorių lentelėms skirtas vertinimo šablonas.

Kiekybinio vertinimo „VIROTECH“ kokliušo toksino IgG kiekybinio vertinimo rinkiniu ribinis diapazonas apibrėžtas kaip nuo ≥ 40 IU/ml iki < 100 IU/ml, o tai atitinka VE diapazoną nuo ≥ 10 VE iki < 17 VE.

Galimas kiekybiškai vertinti diapazonas yra nuo 5 IU/ml iki 500 IU/ml.

9.3 IgG interpretavimo schema

Pertussis toksino IgG ELISA tarptautiniai vienetai (IU/ml) buvo kalibruojami laikantis PSO tarptautinio standarto. Interpretavimas atitinka vedančiųjų Europos centrų rekomendacijas (7, 11, 12, 13, 15).

IU/ml (PSO)	Interpretavimas
< 40	Neseno kontakto su ligos sukėlėju požymių nėra.
≥ 40 iki < 100	Abejotinas rezultatas. Pareikalauti eigos kontrolės arba nustatyti IgA-anti-PT: - IgA-anti-PT ≤ 11 VE (atitinka < 12 IU/ml): Neseno kontakto su ligos sukėlėju požymių nėra. - IgA-anti-PT > 11 VE (atitinka ≥ 12 IU/ml): Neseno kontakto su ligos sukėlėju požymis, jeigu nuo paskutinio skiepavimo praėjo daugiau kaip 12 mėnesių – atkreipti dėmesį į skiepų statusą!
≥ 100	Neseno kontakto su ligos sukėlėju požymis, jeigu nuo paskutinio skiepavimo praėjo daugiau kaip 12 mėnesių – atkreipti dėmesį į skiepų statusą!

10. Literatūra

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springer-Verlag 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

Paciento mėginių ir ploviklio paruošimas

▼ **Ploviklis:** Koncentratą atskiesti dist./demin. vandeniu, kad susidarytų 1 litras skysčio

**IgG mėginiai – skiedimas
1:101**

pvz.,
10 µl serumo /plazmos + 1000 µl skiedimo buferio
(serumo skiedimo buferis yra paruoštas naudoti)

**IgA mėginiai – atskiesti 1:100
atlikti reumatinių veiksnių adsorbciją su
„RF-SorboTech“**

Pvz.:
5 µl serumo (plazmos) + 450 µl skiedimo buferio +
1 lašas „RF-SorboTech“ ir 15 min. inkubuoti kamb. temp.

Testo eiga

Mėginių inkubavimas

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl pacientų mėginiai

Neutralioji vertė (skiedimo buferis) ir
kontrolinės medžiagos

4 x plauti

400 µl ploviklis

gerai pabelsti, kad pasišalintų perteklius

Konjugato inkubacija

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl konjugato

IgG, IgA

4 x plauti

400 µl ploviklis

gerai pabelsti, kad pasišalintų perteklius

Substrato inkubacija

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl substrato

Fiksavimas

50 µl fiksavimo skysčio

atsargiai papurtyti, kad susimaišytų

Ekstinkcijos
matavimas

**Fotometras su 450/620 nm
filtru**
(referencinis bangų ilgis 620–
690 nm)