

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

Nr zamówienia: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

Nr zamówienia: EN215Q60

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

Nr zamówienia: EC215A00

Kod barwny:

IgG: srebrny/ciemnoniebieski

IgA: srebrny/czarny

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.VIROTECHdiagnostics.com>



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zestaw do oznaczania IgG.....	3
3.2 Zestaw do oznaczania ilościowego IgG.....	3
3.3 Zestaw do oznaczania IgA	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	4
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie).....	4
7. Wykonanie badania.....	4
7.1 Materiał do badań	5
7.2 Przygotowanie odczynników	5
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA	5
8. Jakościowa i półilościowa ocena wyników badania	6
8.1 Kontrola badania.....	6
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schemat oceny IgG	6
8.4 Schemat oceny IgA.....	7
8.5 Ograniczenia testu	7
9. Ilościowa ocena wyników badania IgG w j.m./ml	8
9.1 Kontrola badania.....	8
9.2 Obliczenie wyników ilościowych w jednostkach międzynarodowych na mililitr (j.m./ml)	8
9.3 Schemat interpretacji IgG.....	8
10. Literatura.....	9
11. Schemat przebiegu badania	10

1. Cel zastosowania

Test ELISA Toksyna Krztuśca (PT) służy do półilościowego i jakościowego oznaczenia przeciwciał IgG lub IgA w surowicy ludzkiej. Służy do stwierdzenia ostrego zakażenia lub niedawno przebytego zakażenia wzgl. wykrywania przeciwciał poszczepiennych (kontrola skuteczności szczepienia). W IgG ponadto możliwe jest oznaczanie ilościowe w jednostkach międzynarodowych na mililitr (j.m./ml) przy użyciu osobno dostępnego zestawu do oznaczania ilościowego IgG (EN215Q60).

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydazy) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zestaw do oznaczania IgG

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 łamliwych dołków opłaszczonych antygenami , , .
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
8. **tetrametylobenzydyna – roztwór substratu (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gotowy do użycia
9. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszanę kwasów

3.2 Zestaw do oznaczania ilościowego IgG

1. **IgG kontrola kalibracyjna, 2000 µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
2. **IgG kontrola słabo reagująca, 2000 µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
3. **IgG kontrola mocno reagująca, 2000 µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia

3.3 Zestaw do oznaczania IgA

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 łamliwych dołków opłaszczonych antygenami , , .
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgA kontrola negatywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgA kontrola cut-off, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgA kontrola pozytywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **koniugat IgA 2 (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
8. **tetrametylobenzydyna – roztwór substratu (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gotowy do użycia
9. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszanę kwasów

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

- Po pobraniu wymaganych pojedynczych dołków pozostałe pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
- Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
- Wyjąć tylko potrzebną do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Material	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzodyna (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

- Jako surowice kontrolne stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
- Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
- Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

- woda destylowana/demin.
- pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
- mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
- próbówki
- chusty z masy celulozowej
- przykrywka płytek ELISA
- pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
- ręczna płuczka ELISA lub automatyczna płuczka mikropłytek
- spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
- inkubator

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiał do badań

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i płukania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole należy stosować swoiście dla parametrów i wyłącznie z serią płytek podaną w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do płukania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).
5. **W celu prawidłowego oznaczenia IgA przeciwko toksynie krztuścowej konieczne jest wstępne potraktowanie surowic środkiem RF-Sorbotech** (absorbentem firmy VIROTECH). W kontrolach IgA nie ma wstępnej adsorpcji.

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę dodać pipetami po 100µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (ślepa próba), kontroli i rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off i kontroli kalibracyjnej podwójnie oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10µl surowicy + 1ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołków.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołków dodać pipetami po 50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, aż płyny całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodny żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzeń.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu. Takie postępowanie gwarantuje nienaganne działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Jakościowa i półilościowa ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do półilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG i IgA, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągana jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$VE_{\text{(kontrola pozytywna)}} = \frac{OD_{\text{(kontrola pozytywna)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(surowica pacjenta)}} = \frac{OD_{\text{(surowica pacjenta)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$

8.3 Schemat oceny IgG

Jednostki VIROTECH (VE) testów ELISA IgA przeciwko toksynie krztuścowej skalibrowano z międzynarodowym standardem WHO. Wynika z tego podana w ocenie współzależność między jednostkami VIROTECH (VE) a jednostkami międzynarodowymi na mililitr (j.m./ml) dla IgG (7).

j.m./ml (WHO)	VE	Przeciwciała IgG	Interpretacja
	< 9	negatywne	⇒ <i>brak podwyższonego miana przeciwciał przeciw toksynie krztuśca:</i> • brak podejrzenia zakażenia <i>B. pertussis</i> W przypadku istnienia symptomatologii klinicznej zażądać kontroli przebiegu lub wyjaśnić w diagnostyce różnicowej
36-44	9 – 11	wartości graniczne	⇒ <i>podwyższone miano przeciwciał przeciw toksynie krztuśca:</i> • przetrwałe przeciwciała przebytego zakażenia • przeciwciała rozpoczynającej się odpowiedzi immunologicznej • przeciwciała poszczepienne
	> 11	pozytywne	⇒ <i>znacząco wysokie miano przeciwciał przeciw toksynie krztuśca:</i> • wskazówka odnośnie świeżego lub niedawno przebytego zakażenia • rozpoznanie przeciwciał poszczepiennych: koniecznie uwzględnić kalendarz szczepień, ponieważ badanie nie rozróżnia pomiędzy przeciwciałami poszczepiennymi i przeciwciałami infekcyjnymi.

≥ 100	≥ 17	zakażenie	$\Rightarrow$ <i>znacząco wysokie miano przeciwciał przeciw toksynie krztuśca, które przemawia za ostrym zakażeniem, jeżeli ostatnie szczepienie jest starsze niż 12 miesięcy</i>
------------	-----------	-----------	---

8.4 Schemat oceny IgA

Test ELISA IgA przeciwko toksynie krztuścowej dostosowano do międzynarodowego standardu WHO. Wynika z tego podana w ocenie współzależność między jednostkami VIROTECH (VE) a jednostkami międzynarodowymi na mililitr (j.m./ml) dla IgA (11, 12).

j.m./ml (WHO)	VE	Przeciwciała IgA	Interpretacja
< 12 j.m./ml	< 9	negatywne	$\Rightarrow$ <i>brak podwyższonego miana przeciwciał przeciw toksynie krztuśca:</i> • brak podejrzenia zakażenia <i>B. pertussis</i> W przypadku istnienia symptomatologii klinicznej zażądać kontroli przebiegu lub wyjaśnić w diagnostyce różnicowej
	9 – 11	wartości graniczne	$\Rightarrow$ <i>podwyższone miano przeciwciał przeciw toksynie krztuśca:</i> • przetrwałe przeciwciała przebytego zakażenia • przeciwciała rozpoczynającej się odpowiedzi immunologicznej • przeciwciała poszczepienne
≥ 12 j.m./ml	> 11	pozytywne	$\Rightarrow$ <i>znacząco wysokie miano przeciwciał przeciw toksynie krztuśca:</i> Przy dodatkowo pozytywnym mianie przeciwciał IgG (> 11 VE): • wskazówka odnośnie świeżego lub niedawno przebytego zakażenia • rozpoznanie przeciwciał poszczepiennych: Koniecznie uwzględnić kalendarz szczepień, ponieważ badanie nie rozróżnia pomiędzy przeciwciałami poszczepiennymi i przeciwciałami infekcyjnymi. Przy dodatkowo negatywnym/granicznym mianie przeciwciał IgG (≤ 11 VE): • zażądać kontroli przebiegu

Wskazówka: Przeciwciała IgA nie zawsze są wytwarzane i tym samym są mniej niezawodnym markerem zakażenia *Bordetella pertussis* niż przeciwciała IgG.

1. Koniecznie uwzględnić kalendarz szczepień, ponieważ badanie nie rozróżnia pomiędzy przeciwciałami poszczepiennymi i przeciwciałami infekcyjnymi.
2. Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są wyższe od zakresu granicznego, to próbki te są traktowane jako pozytywne.
3. Jeżeli zmierzone jednostki VE znajdują się w podanym zakresie granicznym, nie występuje znacząco duże stężenie przeciwciał, próbki są traktowane jako wartości graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakażenia konieczne jest oznaczenie zawartości przeciwciał dwóch próbek surowicy. Pierwsza próbka surowicy powinna być zbadana bezpośrednio po rozpoczęciu zakażenia, a druga próbka 5-10 dni później (surowica rekonwalescencyjna). Stężenie przeciwciał obydwóch próbek musi być oznaczone równolegle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest możliwa prawidłowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
4. Jeżeli zmierzone wartości są niższe od zdefiniowanego zakresu granicznego, w próbce nie występują dające się zmierzyć specyficzne dla antygenów przeciwciała. Probki są traktowane jako negatywne.
5. W przypadku granicznego wyniku IgA oraz występowania wyniku IgG <17 VE w celu wyjaśnienia ostrego zakażenia konieczna druga próbka surowicy.

8.5 Ograniczenia testu

Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.

9. Ilościowa ocena wyników badania IgG w j.m./ml

Gotowa do użycia kontrola kalibracji jest dostępna oddzielnie z zestawem do oznaczania ilościowego IgG (EN215Q60) i służy do ilościowego oznaczenia w j.m./ml przeciwciał IgG przeciwko toksynie krztuścowej w surowicy pacjenta. Kontrola kalibracji wyrównuje wahania uwarunkowane przeprowadzeniem testu. Do obliczenia stosowane są średnie wartości OD.

9.1 Kontrola badania

a) Wartości OD

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartość OD kontroli kalibracyjnej musi znajdować się w zakresie podanym w przynależnym certyfikacie.

b) j.m./ml

Stężenia IgG przeciwko toksynie krztuścowej (j.m./ml) kontroli słabo reagującej i kontroli mocno reagującej muszą znajdować się w zakresach podanych w certyfikacie kontroli jakości.

Jeśli wymagania (wartości OD, j.m./ml) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

9.2 Obliczenie wyników ilościowych w jednostkach międzynarodowych na mililitr (j.m./ml)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być odliczona od wszystkich ekstynkcji.

Oznaczenie ilościowe surowic pacjentów przy użyciu zestawu do oznaczania ilościowego IgG firmy VIROTECH następuje w korelacji z międzynarodowym standardem WHO. W szczegółowych testach dla każdej serii płytek ustalana jest poprzez regresję nieliniową krzywa wzorcowa i opisana matematycznie następującym wzorem (14):

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

Przy czym

- A: oczekiwane OD przy stężeniu IgG przeciwko toksynie krztuścowej wynoszącym 0
- B: współczynnik nachylenia
- C: punkt przegięcia
- D: oczekiwane OD przy nieskończenie dużym stężeniu IgG przeciwko toksynie krztuścowej
- OD korr: skorygowane OD surowicy pacjenta

W celu uwzględnienia wahań w ramach testu zmierzone OD surowicy pacjenta jest korygowane na podstawie kontroli kalibracyjnej:

$$OD \text{ korr} = OD \text{ surowicy pacjenta} * \frac{OD \text{ kontroli kalibracyjnej wytyczne}}{OD \text{ kontroli kalibracyjnej zmierzone}}$$

Wartości parametrów A, B, C i D, jak również wytyczne dla OD kontroli kalibracyjnej można znaleźć w certyfikacie.

Ustalenie j.m./ml

Ustalenie j.m./ml może następować za pomocą oprogramowania do nabycia od firmy VIROTECH. Alternatywnie może być udostępniony szablon do oceny do powszechnie stosowanych arkuszy kalkulacyjnych.

Zakres graniczny podczas oznaczania ilościowego przy użyciu zestawu VIROTECH do oznaczania ilościowego IgG przeciwko toksynie krztuścowej jest zdefiniowany od ≥ 40 j.m./ml do < 100 j.m./ml, co odpowiada zakresowi VE od ≥ 10 VE do < 17 VE.

Zakres oznaczalny ilościowo wynosi od 5 j.m./ml do 500 j.m./ml.

9.3 Schemat interpretacji IgG

Jednostki międzynarodowe (IU/ml) testów ELISA IgG przeciwko toksynie krztuśca były skalibrowane ze standardem międzynarodowym WHO. Interpretacja odpowiada zaleceniom europejskich ośrodków referencyjnych (7, 11, 12, 13, 15).

j.m./ml (WHO)	Interpretacja
<40	Brak oznak niedawnej styczności z czynnikami chorobotwórczymi
≥40 do <100	Wątpliwy wynik. Załączyć kontroli przebiegu lub oznaczenia IgA anty-PT: - IgA anty-PT ≤ 11 VE (odpowiada < 12 j.m./ml): Brak oznak niedawnej styczności z czynnikami chorobotwórczymi. - IgA anty-PT > 11 VE (odpowiada ≥ 12 j.m./ml): Oznaka niedawnej styczności z czynnikami chorobotwórczymi, pod warunkiem, że ostatnie szczepienie było dawniej niż 12 miesięcy temu – zwrócić uwagę na kalendarz szczepień!
≥100	Brak oznak niedawnej styczności z czynnikami chorobotwórczymi, pod warunkiem, że ostatnie szczepienie było dawniej niż 12 miesięcy temu – zwrócić uwagę na kalendarz szczepień!

10. Literatura

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

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do płukania

▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

**Rozcieńczenie próbki IgG w
stosunku
1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do
rozcieńczania

(Roztwór do rozcieńczania surowicy jest gotowy do użycia)

**Rozcieńczenie próbki IgA w stosunku
1:100**

**Adsorpcja czynnika reumatoidalnego za
pomocą RF-SorboTech**

np.:

5 µl surowicy/osocza + 450 µl buforu do rozcieńczania +
1 kroplę RF SorboTech inkubować przez 15 min w temp.

pok.

Wykonanie badania

Inkubacja próbek



4x płukanie



Inkubacja
koniugatu



4x płukanie



Inkubacja substratu



Zatrzymanie



Pomiar ekstynkcji

**30 minut w temperaturze
37°C**

**30 minut w temperaturze
37°C**

**30 minut w temperaturze
37°C**

100 µl próbek pacjentów

Próba ślepa (bufor do rozcieńczania) i
kontrole

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

100 µl koniugatu

IgG, IgA

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

100 µl substratu

**50 µl roztworu do
zatrzymania reakcji**

ostrożnie wstrząsnąć

**Fotometr przy 450/620nm
(referencyjna długość fali 620-
690nm)**