

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

objednací číslo: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

objednací číslo: EN215Q60

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

objednací číslo: EC215A00

**barevné kódování :
IgG: stříbrná / tmavomodrá
IgA: stříbrná / černý**

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

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

**tel.: +49-6142-6909-0
fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy	3
3.1 IgG testovací kit	3
3.2 Kvantifikační sada IgG	3
3.3 IgA testovací kit	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensií připravených k použití	3
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)	4
7. Testování	4
7.1 Testovaný materiál	4
7.2 Příprava reagensií	4
7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH	5
7.4 Použití analyzátorů ELISA	5
8. Kvalitativní a semikvantitativní vyhodnocení testu	5
8.1 Kontrola funkčnosti testu	5
8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)	6
6	
8.3 Schéma vyhodnocení IgG	6
8.4 Schéma vyhodnocení IgA	6
8.5 Limity testu	7
9. Kvantitativní vyhodnocení testu IgG v IU/ml	7
9.1 Funkční kontrola testu	7
9.2 Výpočet kvantitativních výsledků v mezinárodních jednotkách na mililitr (IU/ml)	7
9.3 Interpretační schéma IgG	8
10. Literatura	9
11. Schéma provedení testu (Testablaufschemata)	10

1. Účel použití

Přípravek Pertussis Toxin ELISA (toxin černého / dávivého kašle ELISA) prokazuje semikvantitativně a kvalitativně příslušné protilátky IgG nebo IgA v lidském séru.

Slouží k prokázání akutní infekce nebo nedávno prodělané infekce, popřípadě k detekci protilátek vzniklých v důsledku očkování (ke kontrole úspěšnosti očkování). V IgG je proto možná kvantifikace v mezinárodních jednotkách na mililitr (IU/ml), za použití kvantifikační sady IgG (EN215Q60), která je k dostání zvlášť.

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenávané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenávané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změni na žluté.

3. Obsah soupravy

3.1 IgG testovací kit

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **Ředící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **IgG negativní kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgG hraniční kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgG pozitivní kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgG konjugát (anti-human), 11ml**, (ovčí nebo ostrucha křivočará)-křen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
8. **Substrátový roztok tetrametylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
9. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

3.2 Kvantifikační sada IgG

1. **Kalibrační kontrola IgG, 2000 µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
2. **Slabě reaktivní kontrola IgG, 2000 µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
3. **Silně reaktivní kontrola IgG, 2000 µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné

3.3 IgA testovací kit

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **Ředící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **IgA negativní kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgA hraniční kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgA pozitivní kontrola, 2000µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgA konjugát 2 (anti-lidský), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha křivočará) s křenovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS – fetální telecí sérum)
8. **Substrátový roztok tetrametylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
9. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagentů připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagentů je vyznačena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Činidla ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě, že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	nezředěný, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a shledána negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součásti obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová pipeta 50µl, 100µl
3. Mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buničiny
6. Víčka na destičky ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destiček
9. Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor

7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního předpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagancií), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Zředění pacientů používejte vždy čerstvá.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení.

1. Používejte pouze čerstvá, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagentů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysoký stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k ředění a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny šarže a parametry. Kontroly k

okamžitému použití jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně s šarží destiček uvedenou v certifikátu kontroly kvality.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započítím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna činidla temperována na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagenty před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentráty tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepejte).
5. **Pro správné stanovení Pertussis Toxin IgA je nutné, aby byla séra předem upravena pomocí RF-SorboTech** (adsorbent VIROTECH). U kontrol IgA odpadá předběžná adsorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Pipetujte na testovací dávku 100µl okamžitě použitelného zředovacího pufru (prázdná hodnota), kontrol a zředěných sér pacientů. Doporučujeme vždy dvojitou dávku (prázdná hodnota, kontroly a séra pacientů); za použití cut-off a při kalibrační kontrole je dvojitá dávka naléhavě nutná. Pracovní zředění sér pacientů: 1+100; např. 10µl séra + 1ml zředovacího pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destička se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí čtyřikrát promývacím roztokem 350 - 400µl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100µl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po inkubaci konjugátu následuje čtyřnásobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destičku opatrně a pečlivě protřepte poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně žlutě zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl o odečteno od absorbancí kontrol a vzorků.. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

7.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA překontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Překontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

8. Kvalitativní a semikvantitativní vyhodnocení testu

Okamžitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG a IgA protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výkvy podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosahována vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

8.1 Kontrola funkčnosti testu

a) Hodnoty optické density

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15.

Hodnoty optické density negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické density uváděné v certifikátu o kontroly kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i cut off kontrol by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) cut off kontrol jsou definovány 10 VE. Vypočtené VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\begin{aligned} \text{VE pozitivní kontrola} &= \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{OD hraniční}} \times 10 \\ \text{VE vzorek} &= \frac{\text{OD vzorek}}{\text{OD hraniční}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schéma vyhodnocení IgG

Jednotky VIROTECH (*VIROTECH Einheiten*, VE) testů ELISA *Pertussis Toxin IgG* byly kalibrovány podle mezinárodní normy WHO. Z toho vyplývá korelace uvedená ve vyhodnocení mezi jednotkami VIROTECH (VE) a mezinárodními jednotkami na mililitr (IU/ml) pro IgG (7).

IU/ml (WHO)	VE	protilátky IgG	interpretace
	< 9	negativní	⇒ <i>nezvýšený titr Ak proti toxinu černého kašle:</i> - není podezření na infekci <i>Bordetella pertussis</i> - při existenci klinických symptomů vyžádat průběžnou kontrolu nebo stav vyjasnit diferenciální diagnostikou
36-44	9 – 11	mezní hodnota	⇒ <i>zvýšený titr Ak proti toxinu černého kašle:</i> - persistující Ak minulé infekce - Ak začínající imunní odpovědi - protilátky vzniklé v důsledku očkování
	> 11	pozitivní	⇒ <i>signifikantně vyšší titr Ak proti toxinu černého kašle:</i> - důkaz čerstvé nebo nedávno prodělané infekce - detekce protilátek vzniklých v důsledku očkování: bezpodmínečně dbejte na očkovací management, protože tento test neumí rozlišovat mezi protilátkami vzniklými v důsledku očkování a protilátkami z důvodu infekce
≥ 100	≥ 17	infekce	⇒ <i>signifikantně vyšší titr Ak proti toxinu černého kašle, který svědčí o akutní infekci, pokud poslední očkování bylo provedeno před více než 12 měsíci</i>

8.4 Schéma vyhodnocení IgA

Test ELES *Pertussis Toxin IgA* byl přizpůsoben podle mezinárodní normy WHO. Z toho vyplývá korelace uvedená ve vyhodnocení mezi jednotkami VIROTECH (VE) a mezinárodními jednotkami na mililitr (IU/ml) pro IgA (11, 12).

IU/ml (WHO)	VE	protilátky IgA	Interpretace
< 12 IU/ml	< 9	negativní	⇒ <i>nezvýšení titr Ak proti toxinu černého kašle:</i> není podezření na infekci <i>B. pertussis</i> Při existenci klinických symptomů vyžádat průběžnou kontrolu nebo stav vyjasnit diferenciální diagnostikou
	9 – 11	mezní hodnota	⇒ <i>zvýšený titr Ak proti toxinu černého kašle:</i> persistující Ak minulé infekce

			• Ak začínající imunní odpovědi • protilátky vzniklé v důsledku očkování
≥ 12 IU/ml	> 11	pozitivní	⇒ <i>signifikantně vyšší titr Ak proti toxinu černého kašle:</i> Při dalším pozitivním titru IgG Ak (> 11 VE): • upozornění na čerstvou nebo nedávno prodělanou infekci • detekce protilátek: bezpodmínečně dbejte na očkovací management, protože test neumí rozlišovat mezi protilátkami vzniklými v důsledku očkování a protilátkami z důvodu infekce Při dalším negativní/mezním titru IgG Ak (≤ 11 VE): • vyžádat průběžnou kontrolu.

Upozornění: Protilátky IgA nejsou tvořeny stále a jsou proto méně spolehlivým charakteristickým prvkem pro důkaz infekce *Bordetella pertussis* než protilátky IgG.

1. Bezpodmínečně dbejte na management očkování, protože tento test neumí rozlišovat mezi protilátkami vzniklými v důsledku očkování a protilátkami vzniklými v důsledku infekce.
2. Pokud jsou naměřené hodnoty VE vzorku nad oblastí mezních hodnot, jsou vzorky považovány za pozitivní.
3. Nacházejí-li se naměřené hodnoty VE vzorku uvnitř uvedené oblasti mezních hodnot, neexistuje signifikantně vyšší koncentrace protilátek; na vzorky je třeba pohlížet jako na vzorky s mezními hodnotami koncentrace. Pro bezpečné prokázání infekce je zapotřebí určit obsah protilátek ve dvou vzorcích séra. Jeden vzorek séra by měl být podroben testu bezprostředně po začátku infekce, druhý o 5 až 10 dní později (tzv. rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být zjišťovány paralelně, tj. v jedné testovací várce. Korektní diagnóza na základě vyhodnocení výsledku testu jediného vzorku není možná.
4. Nacházejí-li se naměřené hodnoty pod definovanou mezní oblastí, nejsou ve vzorku přítomny žádné antigenově specifické protilátky. Na vzorky je třeba pohlížet jako na negativní.
5. Při výsledku IgA v mezní oblasti a výsledku IgG < 17 VE je k objasnění akutní infekce zapotřebí druhý vzorek séra.

8.5 Limity testu

1. Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.

9. Kvantitativní vyhodnocení testu IgG v IU/ml

Kalibrační kontrola k okamžitému použití je k dostání zvlášť s kvantifikační sadou IgG (EN215Q60) a slouží ke kvantitativnímu stanovení (v IU/ml) protilátek anti-PT IgG v séru pacienta. Kalibrační kontrola vyrovnává kolísání způsobené při provádění testu. Pro výpočet se používají průměrné hodnoty nebo hodnoty OD.

9.1 Funkční kontrola testu

a) hodnoty OD

Hodnota OD prázdné hodnoty by měla být $< 0,15$.

Hodnota OD kalibrační kontroly se musí nacházet v rozsahu uvedeném v příslušném certifikátu.

b) IU/ml

Koncentrace anti-PT IgG (IU/ml) slabě reaktivní kontroly a silně reaktivní kontroly se nacházejí v rámci rozsahů uvedených v certifikátu kontroly jakosti.

Nebudou-li splněny požadavky (hodnoty OD, IU/ml), je třeba test opakovat.

9.2 Výpočet kvantitativních výsledků v mezinárodních jednotkách na mililitr (IU/ml)

Extinkce prázdné hodnoty (450/620nm) musí být odečtena od všech extinkcí.

Kvantifikace sér pacientů se soupravou pro kvantifikaci VIROTECH IgG probíhá na základě korelace s mezinárodní normou WHO. Rozsáhlým testováním se pro každou šarži destiček stanoví standardní křivka nelineární regresi a popíše se matematicky následujícím vzorcem (14):

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

Přičemž je

- A: očekávaná OD při koncentraci anti-PT IgG 0
 B: faktor stoupání
 C: bod zvratu
 D: očekávaná OD při nekonečně vysoké koncentraci anti-PT IgG
 OD kor: korigovaná OD séra pacienta

S přihlédnutím ke kolísání při zpracování testu se naměřená OD séra pacienta koriguje pomocí kalibrační kontroly:

$$OD \text{ kor} = OD \text{ sérum pacienta} * \frac{OD \text{ kalibrační kontrola zadání}}{OD \text{ kalibrační kontrola měřená}}$$

Hodnoty parametrů A, B, C a D, jakož i zadání pro OD kalibrační kontroly, je třeba zjistit z certifikátu.

Stanovení IU/ml

Stanovení IU/ml lze provádět pomocí software, které lze zakoupit od firmy VIROTECH. Alternativně lze poskytnout vyhodnocující předlohu pro běžné tabulkové kalkulace.

Mezní rozsah při kvantifikaci pomocí kvantifikační sady VIROTECH Pertussis Toxin IgG je definován ≥ 40 IU/ml až < 100 IU/ml, což odpovídá rozsahu VE od ≥ 10 VE do < 17 VE.

Kvantifikovatelný rozsah se nachází mezi 5 IU/ml a 500 IU/ml.

9.3 Interpretací schéma IgG

Mezinárodní jednotky (IU/ml) testů ELISA Pertussis Toxin IgG byly kalibrovány podle mezinárodní normy WHO. Interpretace odpovídá doporučení evropských referenčních center (7, 11, 12, 13, 15).

IU/ml (WHO)	Interpretace
< 40	Žádný důvod pro nedávný kontakt s původcem nákazy.
≥ 40 až < 100	Sporný výsledek. Vyžádat průběžnou kontrolu nebo stanovení IgA-anti-PT: - IgA-anti-PT ≤ 11 VE (odpovídá < 12 IU/ml): žádný důvod pro nedávný kontakt s původcem nákazy, - IgA-anti-PT > 11 VE (odpovídá ≥ 12 IU/ml): důvod pro nedávný kontakt s původcem nákazy, dle předpokladu uplynulo od posledního očkování více než 12 měsíců – dodržujte očkovací management!
≥ 100	Důvod pro nedávný kontakt s původcem nákazy, dle předpokladu uplynulo od posledního očkování více než 12 měsíců – dodržujte očkovací management!

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

Příprava vzorků a promývacího roztoku

▼ **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

zředění vzorky IgG
1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

zředění Vzorky IgA
1:100

adsorpce revmatoidního faktoru pomocí
RF-SorboTech

např.:

5 µl sérum/plazmy + 450 µl ředícího roztoku na vzorek +
1 kapka RF- SorboTech , inkubace při pokojové teplotě
po dobu 15 minut

Schéma testu

inkubace vzorků



4 x promýt



inkubace
s konjugátem



4 x promýt



inkubace
se substrátem



Zastavení reakce
stop roztokem



změřit absorbanci

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C ve tmě

100 µl zředěného vzorku
100 µl kontrol

blank (ředící roztok na vzorek)

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl konjugátu
IgG, IgA

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl substrátu

50 µl stop roztoku
opatrně poklepat

mikrofotometr při
450/620nm
(Délka referenční vlny 620-690nm)