

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

Obj. č.: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

Obj. č.: EN215Q60

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

Obj. č.: EC215A00

Farebné kódovanie:
IgG: strieborné/tmavomodré
IgA: strieborné/čierne

POUŽÍVAŤ LEN PRE DIAGNOSTIKU IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.VIROTECHdiagnostics.com>



Obsah

1. Účel použitia	3
2. Princíp testu	3
3. Obsah balenia.....	3
3.1 Testovacia súprava IgG	3
Súprava na kvantifikáciu IgG	3
3.2 Testovacia súprava IgA.....	3
4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie	4
5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia.....	4
6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)	4
7. Vykonanie testu.....	4
7.1 Vyšetrovaný materiál.....	4
7.2 Príprava reagensí.....	5
7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Použitie procesorov ELISA.....	5
8. Kvalitatívne a semikvantitatívne vyhodnotenie testu	6
8.1 Kontrola fungovania testu.....	6
8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schéma vyhodnotenia IgG	6
8.4 Schéma vyhodnotenia IgA	7
8.5 Hranice testu.....	7
9. Kvantitatívne vyhodnotenie testu IgG v IU/ml	8
9.1 Kontrola fungovania testu.....	8
9.2 Výpočet kvantitatívnych výsledkov v medzinárodných jednotkách na mililiter (IU/ml)	8
9.3 Schéma interpretácie IgG.....	8
10. Literatúra.....	9
11. Schéma priebehu testu	10

1. Účel použitia

ELISA toxínu pertussis semikvantitatívne a kvalitatívne stanovuje protilátky IgG alebo IgA v humánnom sére.

Súprava je určená na stanovenie akútnej infekcie alebo nedávno prekonanej infekcie, resp. na detekciu očkovacích protilátok (kontrola úspešnosti očkovania). U IgG je v ďalšom možné vykonať kvantifikáciu v medzinárodných jednotkách na mililitr (IU/ml) pri použití oddelene dodávaných súprav na kvantitatívne stanovenie IgG (EN215Q60).

2. Princíp testu

Protilátka hľadaná v ľudskom sére tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitračnej doske imunitný komplex. Nenaviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neviazané imunoglobulíny sa opäť odstránia premývaním. Po pridaní roztoku substrátu (TMB) vznikne v dôsledku enzymatickej aktivity (peroxidáza) modré farbivo, ktoré po pridaní zastavovacieho roztoku sa premení na žlté.

3. Obsah balenia

3.1 Testovacia súprava IgG

1. **1 mikrotitračná doska** pozostávajúca z 96 odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom,
2. **riediaci pufer PBS (modrý, pripravený na použitie) 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
3. **premývací roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a s Tween 20
4. **IgG negatívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
5. **IgG kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgG pozitívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgG konjugát (antihumánný), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
8. **Tetrametylbenzidín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, pripravený na použitie
9. **Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml**, obsahuje zmes kyselín

Súprava na kvantifikáciu IgG

IgG kalibračné kontrolné sérum, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie

IgG slabo reaktívny kontrolný roztok, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie

IgG vysoko reaktívny kontrolný roztok, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie

3.2 Testovacia súprava IgA

1. **1 mikrotitračná doska** pozostávajúca z 96 odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom,
2. **riediaci pufer PBS (modrý, pripravený na použitie) 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
3. **premývací roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a s Tween 20
4. **IgA negatívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
5. **IgA kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgA pozitívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgA konjugát (antihumánný), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
8. **Tetrametylbenzidín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, pripravený na použitie
9. **Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml**, obsahuje zmes kyselín

4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie

Testovaciu súpravu uchovávať pri 2-8 °C. Trvanlivosť jednotlivých zložiek je uvedená na príslušných štítkoch, trvanlivosť súpravy pozri na certifikáte kontroly kvality.

- Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prúžky v uzavretom vrecku s pohlčovačom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneď po použití znovu skladujte pri 2-8 °C.
- Konjugát pripravený na použitie a roztok substrátu TMB sú citlivé na svetlo a musia sa uchovávať v tme. Ak sa v dôsledku dopadu svetla roztok substrátu sfarbí, musí sa zlikvidovať.
- Z konjugátu pripraveného na použitie, resp. TMB odoberte len množstvo potrebné pre vykonanie testu. Nadbytok odobratého konjugátu, resp. TMB sa nesmie vrátiť späť, ale musí sa zahodiť.

Materiál	Stav	Skladovanie	Trvanlivosť
Skúšobné vzorky	Zriedené	+2 až +8 °C	max. 6 h
	Nezriedené	+2 až +8 °C	1 týždeň
Kontrolné roztoky	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Mikrotitračná platnička	po otvorení	+2 až +8 °C (skladovanie s dodávaným vakom s hydrofóbnym adsorbentom)	3 mesiace
RF absorbent	nezriedené, po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	Zriedený	+2 až +8 °C	1 týždeň
Konjugát	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Tetrametylbenzidín (TMB)	po otvorení	+2 až +8 °C (chránený pred svetlom)	3 mesiace
Zastavovací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Premývací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	finálne zriedený roztok (pripravený na použitie)	+2 až +25 °C	4 týždne

5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

- Ako kontrolné séra sa používajú len také séra, ktoré boli testované a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitídy-B boli uznané za negatívne. Napriek tomu je nutné všetky vzorky, zriedené vzorky, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitračné prúžky považovať za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce.
- Zložky, ktoré obsahujú konzervačný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráždivo na pokožku, oči a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneď umyť tečúcou vodou a prípadne vyhľadať lekára.
- Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

- Destilovaná/demineralizovaná voda
- Viackanálová pipeta 50 µl, 100 µl
- Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Skúmavky
- Rúšok z buničiny
- Kryt platničiek ELISA
- Odpadový kontajner pre infekčný materiál
- Umyváčka rúk ELISA a automatická premývačka mikrotitračných platní
- Spektrofotometer pre mikrotitračné platne so 450/620 nm filtrom (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)
- Inkubátor

7. Vykonanie testu

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržanie pracovného predpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Vyšetrovaný materiál

Ako skúšobnú vzorku možno použiť sérum a plazmu (druh antikoagulancií tu nehrá úlohu), aj keď v tomto príbalovom letáku sa spomína len sérum.

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia použiť vždy čerstvé.

V prípade dlhšieho uloženia sa séra musia zmraziť. Viacnásobné rozmrazovanie je neprípustné..

1. Používajte len čerstvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
2. Nepoužívajte hyperlipemické, hemolytické, mikrobiálne kontaminované vzorky a zakalené séra (poskytujú nesprávne pozitívne/negatívne výsledky).

7.2 Príprava reagensí

Diagnostický systém VIROTECH Diagnostics poskytuje vysokú mieru flexibility tým, že umožňuje použiť riediaci a premývací pufer, zastavovací roztok citrónanu a TMB, ako aj konjugát pri presiahnutí parametrov a šarže. Kontrolné roztoky prípravené na použitie sú so špecifickými parametrami a musia sa používať výlučne s doskami, ktorých šarža je uvedená v osvedčení kontroly kvality

1. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
2. Všetky reagensie zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími prúžkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potraсте.
4. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentráte tvoria kryštálky, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potraсте).
5. **Na dosiahnutie správneho určenia protilátok triedy IgA proti toxínu pertussis je potrebné séra najskôr upraviť pomocou prípravku RF-SorboTech** (adsorpčný prostriedok radu VIROTECH). V prípade kontrol protilátok triedy IgA adsorpcia odpadá.

7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA

1. Do každej sady testovaných vzoriek napipetujte 100 µl riediaceho pufru pripraveného na použitie (hodnota slepého pokusu), kontrolných roztokov a nariadených sér pacientov. Odporúčame zakaždým dvojítu sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov); pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojitá sada naľahavo potrebná. Pracovné nariadenie sér pacientov 1+100; napr. 10 µl séra + 1 ml riediaceho pufru.
2. Po napipetovaní nasleduje inkubácia 30 min pri 37 °C (s krytom).
3. Inkubačný cyklus ukončíte 4-násobným premývaním, pričom zakaždým použijete 350-400 µl premývacieho roztoku. Premývací roztok nenechajte stáť v jamkách, ale odstráňte jeho posledné zvyšky vyklopaním na buničinový podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikryté).
6. Inkubáciu konjugátu ukončíte 4-násobným premytím (pozri bod 3).
7. Napipetujte do každej jamky 100 µl substrátového roztoku TMB, pripraveného na priame použitie.
8. Substrátový roztok inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikrytý, v temnej miestnosti).
9. Reakciu substrátu ukončíte napipetovaním 50 µl zastavovacieho roztoku citrónanu do každej jamky. Dosku opatrne a dôkladne potraсте, až kým sa tekutiny celkom nepremiešajú a kým nie je vidieť jednotné žlté sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpočítala od všetkých ostatných extinkcií. Fotometrické meranie sa musí uskutočniť do jednej hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Pribehovú schému testu pozri na poslednej strane.

7.4 Použitie procesorov ELISA

Všetky testy ELISA firmy VIROTECH Diagnostics sa môžu vykonať pomocou procesorov ELISA. Používateľ je povinný prístroj pravidelne validovať.

VIROTECH Diagnostics odporúča nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. väčších opravách vášho procesora ELISA odporúča firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predlôh výrobcu prístroja.
2. Odporúča sa procesor ELISA následne vyskúšať pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúšanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrt' roka.

3. Pri každom testovacom behu sa musia splniť kritériá pre uvoľnenie do distribúcie uvedené v certifikáte kontroly kvality, ktorý bol vystavený k danému produktu.

Tento postup zabezpečuje bezchybnú funkciu vášho procesoru ELISA a okrem toho slúži k zabezpečeniu kvality laboratória.

8. Kvalitatívne a semikvantitatívne vyhodnotenie testu

Kontrolné roztoky pripravené na použitie slúžia k semikvantitatívnemu stanoveniu špecifických protilátok IgG, IgA a IgM, ktorých koncentrácia je uvedená v jednotkách VIROTECH - "VIROTECH Einheiten" (= VE). Vykonaním testu sa podmienené odchýlky metódou výpočtu vyrovnávajú, čím sa dosiahne vysoká reprodukovateľnosť. Pri výpočte VE sa používajú priemerné hodnoty OD (optickej hustoty).

8.1 Kontrola fungovania testu

a. Hodnoty OD

Hodnota OD slepého pokusu by mala byť $< 0,15$.

Hodnoty OD negatívnych kontrolných roztokov by mali byť nižšie ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality, hodnoty OD pozitívnych kontrolných roztokov ako aj kontrolných sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) by mali byť vyššie, ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality.

b. Jednotky VIROTECH (VIROTECH Einheiten - VE)

Jednotky VIROTECH (VE) kontrolných roztokov sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) sú definované ako 10 VE. Vypočítané VE pozitívnych kontrol by sa mali nachádzať v rámci rozpätí, uvedených v certifikáte kontroly kvality.

Ak výsledky testu (hodnoty OD, VE) nezodpovedajú požiadavkám, musí sa test zopakovať.

8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpočítať od všetkých extinkcií.

$$\text{VE (pozit. kontr. roztok)} = \frac{\text{OD (pozitívny kontr. roztok)} - \text{OD (kontr. roztok cut-off)}}{\text{OD (kontr. roztok cut-off)}} \times 10$$

$$\text{VE (sérum pacienta)} = \frac{\text{OD (sérum pacienta)} - \text{OD (kontr. roztok cut-off)}}{\text{OD (kontr. roztok cut-off)}} \times 10$$

8.3 Schéma vyhodnotenia IgG

Jednotky systému VIROTECH (VE) v súpravách ELISA na určovanie protilátok triedy IgG proti toxínu pertussis boli kalibrované s použitím medzinárodnej normy WHO. Z toho vyplýva korelácia medzi VIROTECH-jednotkami (VE) a medzinárodnými jednotkami na mililiter (IU/ml) pre IgG, uvedená vo vyhodnotení (7).

IU/ml (WHO)	VE	Protilátky IgG	Interpretácia
	< 9	negatívne	$\Rightarrow$ <i>žiadne zvýšený titer protilátok proti toxínu pertussis.</i> • žiadne podozrenie na infekciu <i>B. pertussis</i> V prípade klinických symptómov vyžadovať kontrolu priebehu alebo diferenčno-diagnostické objasnenie
36:-44	9 – 11	medzná hodnota	$\Rightarrow$ <i>zvýšený titer protilátok proti toxínu pertussis :</i> • perzistujúce protilátky prekonanej infekcie • protilátky začínajúcej imunoreakcie • protilátky po očkovaní
	> 11	pozitívne	$\Rightarrow$ <i>signifikantne vysoký titer protilátok proti toxínu pertussis:</i>

			- Poukaz na čerstvú alebo len nedávno prekonanú infekciu - Rozpoznanie očkovacích protilátok Bezpodmienečne dbať na očkovací manažment, nakoľko test nedokáže od seba odlíšiť očkovacie protilátky a protilátky proti infekcii
≥ 100	≥ 17	infekcia	⇒ <i>signifikantne vysoký titer proti toxínu pertussis, ktorý hovorí v prospech akútnej infekcie, ak sa posledné očkovanie uskutočnilo pred viac ako 12 mesiacmi</i>

8.4 Schéma vyhodnotenia IgA

Súprava ELISA na určovanie protilátok triedy IgA proti toxínu pertussis bola prispôbena medzinárodnej norme WHO. *** Z toho vyplýva korelácia medzi VIROTECH-jednotkami (VE) a medzinárodnými jednotkami na mililiter (IU/ml) pre IgA, uvedená vo vyhodnotení.

IU/ml (WHO)	VE	Protilátky IgA	Interpretácia
< 12 IU/ml	< 9	negatívne	⇒ <i>žiadne zvýšený titer protilátok proti toxínu pertussis.</i> žiadne podozrenie na infekciu <i>B. pertussis</i> V prípade klinických symptómov vyžiadať kontrolu priebehu alebo diferenčno-diagnostické objasnenie
	9 – 11	medzná hodnota	⇒ <i>zvýšený titer protilátok proti toxínu pertussis :</i> - perzistujúce protilátky prekonanej infekcie - protilátky začínajúcej imunoreakcie - protilátky po očkovaní
≥ 12 IU/ml	> 11	pozitívne	⇒ <i>signifikantne vysoký titer protilátok proti toxínu pertussis:</i> Pri doplnkovo pozitívnom titri protilátok IgG (> 11 VE): - Poukaz na čerstvá alebo len nedávno prekonanú infekciu - Rozpoznanie očkovacích protilátok Bezpodmienečne dbať na manažment očkovania, nakoľko test nedokáže od seba odlíšiť očkovacie protilátky a protilátky proti infekcii Pri doplnkovo zápornom/medznom titri protilátok IgG (≤ 11 VE): - Požiadat' o kontrolu priebehu.

Upozornenie: Protilátky IgA sa netvoria vždy, a preto sú pre infekciu vírusom *Bordetella pertussis* menej spoľahlivým markerom ako protilátky IgG.

- Je nevyhnutné dbať na manažment očkovania, nakoľko test nedokáže od seba odlíšiť očkovacie protilátky a protilátky proti infekcii
- Ak sa namerané hodnoty VE vzorky nachádzajú nad hraničným rozsahom, považujú sa vzorky za pozitívne (dbajte na manažment očkovania!).
- Ak sa namerané hodnoty VE nachádzajú vo vnútri uvedeného hraničného rozsahu, nejde o žiadnu signifikantne vysokú koncentráciu protilátok; vzorky sa považujú za hraničné. Pre bezpečný dôkaz infekcie je nutné stanoviť obsah protilátok dvoch vzoriek séra. Jedna vzorka séra by sa mala otestovať priamo po začiatku infekcie, druhá vzorka 5–10 dní neskôr (rekonvalescenčné sérum). Koncentrácia oboch vzoriek sa musí stanoviť paralelne, t. j. v rovnakej testovacej sade. Správna diagnóza na základe hodnotenia jednej vzorky séra nie je možná.
- Ak sa namerané hodnoty nachádzajú pod definovaným hraničným rozsahom, nenachádzajú sa vo vzorke žiadne merateľné protilátky špecifické pre daný antigén. Vzorky sú považované za negatívne.
- Pri hraničnom výsledku IgA a pri získaní výsledku IgG <17 VE sa musí otestovať ďalšia vzorka, aby sa objasnilo, či ide o akútnu infekciu.

8.5 Hranice testu

- Interpretácia sérologických výsledkov musí vždy zahrnúť klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne výsledky, ktoré sú k dispozícii.

9. Kvantitatívne vyhodnotenie testu IgG v IU/ml

Kalibračný kontrolný roztok pripravený na použitie je k dispozícii oddelene spolu s kvantifikačnou sadou IgG (EN215Q60) a je určený na kvantitatívne stanovenie anti-PT protilátok IgG v pacientovom sére vyjadrené v IU/ml. Kalibračný kontrolný roztok vyrovnáva výkyvy podmienené vykonaním testu. Pre výpočet sa použijú priemery hodnôt OD.

9.1 Kontrola fungovania testu

a. Hodnoty OD

Hodnota OD slepého pokusu by mala byť <0,15

Hodnota OD kalibračného kontrolného roztoku sa musí nachádzať v rozsahu, ktorý je uvedený v príslušnom osvedčení.

b) IU/ml

Koncentrácie anti-PT IgG (IU/ml) slabo reagujúceho kontrolného roztoku a silne reaktívneho kontrolného roztoku sa musia nachádzať v rozsahu uvedenom v osvedčení kontroly kvality.

Ak výsledky testu (hodnoty OD, IU/ml) nezodpovedajú požiadavkám, musí sa test zopakovať.

9.2 Výpočet kvantitatívnych výsledkov v medzinárodných jednotkách na mililiter (IU/ml)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpočítať od všetkých extinkcií

Určovanie protilátok v patientských sérach pomocou súpravy radu VIROTECH na určovanie množstva protilátok triedy IgG prebieha v súlade s medzinárodnou normou WHO. Rozsiahlymi testovaniami sa pre každú šaržu dosky stanoví štandardná krivka pomocou nelineárnej regresie a matematicky je opísaná nasledujúcim vzorcom (14):

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

Pritom je

A: očakávané OD pri koncentrácii anti-PT IgG rovnajúcej sa 0

B: faktor stúpania

C: bod zvratu

D: očakávaná hodnota OD pri nekonečne vysokej koncentrácii anti-PT IgG

korigované OD: korigované OD pacientovho séra

Pre zohľadnenie výkyvov v rámci spracovania testu sa nameraná hodnota OD pacientovho séra koriguje podľa kalibračného kontrolného roztoku:

$$OD_{\text{korr}} = OD_{\text{sérum pacienta}} * \frac{OD_{\text{kalibr. kontr. roztok normovaný}}}{OD_{\text{Kkalibr. kontr. roztok meraný}}}$$

Hodnoty parametrov A, B, C a D, ako aj nastavovací údaj pre OD kalibračného kontrolného roztoku sa musia prevziať z osvedčenia.

Stanovenie IU/ml

Stanovenie IU/ml sa môže uskutočniť pomocou softvéru, ktorý si možno objednať u firmy VIROTECH. Alternatívne je možné získať predlohu vyhodnotenia pre bežné tabuľkové výpočty.

Hraničná oblasť pre kvantifikáciu pomocou kvantifikačnej súpravy VIROTECH Pertussis Toxin IgG je vymedzený rozsahom od ≥ 40 IU/ml po < 100 IU/ml, čo zodpovedá VE oblasti v rozsahu ≥ 10 VE až < 17 VE.

Kvantifikovateľná oblasť sa nachádza medzi 5 IU/ml a 500 IU/ml..

9.3 Schéma interpretácie IgG

Medzinárodné jednotky (IU/ml) súprav ELISA na určovanie protilátok triedy IgG proti toxínu pertussis boli kalibrované s použitím medzinárodnej normy WHO. Interpretácia zodpovedá odporúčaniam európskych referenčných centier (7, 11, 12, 13, 15).

IU/ml (SZO)	Interpretácia
< 40	Žiaden dôkaz nedávneho kontaktu s pôvodcom choroby.
≥ 40 až < 100	Sporný výsledok. Požiadať o kontrolu priebehu alebo stanovenie IgA-anti-PT. - IgA-anti-PT ≤ 11 VE (zodpovedá < 12 IU/ml): Žiaden dôkaz nedávneho kontaktu s pôvodcom choroby. - IgA-anti-PT > 11 VE (zodpovedá ≤ 12 IU/ml): Náznak nedávneho kontaktu s pôvodcom choroby, za predpokladu, že posledné očkovanie sa uskutočnilo pred viac ako 12 mesiacmi – dbať na manažment očkovania!
≥ 100	Náznak nedávneho kontaktu s pôvodcom choroby, za predpokladu, že posledné očkovanie sa uskutočnilo pred viac ako 12 mesiacmi – dbať na manažment očkovania!

10. Literatúra

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), Bakterieller Erreger: *Bordetella pertussis*, 2. Auflage, p98-106

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

▼ **Premývací roztok:** Koncentrát doplniť na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

Vzorky IgG – zriedenie
1:101

napr.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl riediaceho pufru
(riediaci pufer séra je pripravený na použitie)

Vzorky IgA – Zriedenie
1:100

Adsorpcia reumatického faktora pomocou prípravku RF SorboTech

napr.:

5 µl séra/plazmy + 450 µl riediaceho pufru +
1 kvapka prípravku RF-SorboTech inkubovať pri teplote
miestnosti 15 min

Vykonanie testu

Inkubácia vzoriek

30 minút pri 37 °C

100 µl vzorky pacientov

Slepý pokus (riediaci pufer) a kontrolné roztoky

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobré vyklepať

Inkubácia konjugátu

30 minút pri 37 °C

100 µl konjugátu

IgG, IgA

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobré vyklepať

Inkubácia substrátu

30 minút pri 37 °C

100 µl substrátu

Zastaviť

50 µl zastavovacieho roztoku

opatrne potriať

Odmerať extinkciu

Fotometer pri 450/620 nm
(referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)