

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgG LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-32)

Objednací | číslo : WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

Objednací | číslo : WE116G96

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgA LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-32)

Objednací | číslo : WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

Objednací | číslo : WE116A96

POUZE K DIAGNOSTICE IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH

Löwenplatz 5

D- 65428 Rüsselsheim

tel. : +49-6142-6909-0

fax : +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 30.10.2018

REV 7 / VIROTECH B. pertussis + CatACT IgA & IgG LINE Immunoblot CZ

Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu.....	3
3. Obsah balení.....	3
3.1 Souprava pro 32 analýz	3
3.2 Souprava pro 96 analýz	3
4. Přečítávání a použitelnost testovacích souprav a reagensů	4
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není dodáván součástí).....	4
7. Vyžadovaný materiál.....	5
8. Provedení testu.....	5
8.1 Příprava vzorků	5
8.2 Příprava reagensů	5
8.3 Provedení testu Immunoblot	5
8.4 Použití analyzátoru Immunoblot.....	6
9. Vyhodnocení testu.....	6
9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů	6
9.2 Použití hraniční kontroly Cut off	6
9.3 Význam antigenů	7
9.4 Kritéria vyhodnocení.....	7
9.5 Omezení testu	8
10. Literatura.....	8
11. Schéma provedení testu.....	10

1. Účel použití

Testovací souprava (kit) Line Immunoblot slouží ke kvalitativnímu prokázání specifických protilátek třídy IgG, popř. IgA proti bakteriím *Bordetella pertussis* v lidském séru. Kit slouží k rozpoznání první, nedávné nebo před delší dobou prodávající infekci *Bordetella pertussis* nebo k diferenciální diagnostice delší dobu trvajících klinických manifestací s necharakteristickým kašlem. Na základě současněho průkazu specifických protilátek proti pertusovému toxinu (PT) a katalytické části toxinu adenylát cyklázy (CatACT) může být ve vztahu k předpokladu usnadněno rozlišení infekce *Bordetella pertussis* a ovládnutí.

Line Immunoblot může dále ukázat na možnost přetrvání infekce *B. parapertussis*. Absence specifických protilátek proti PT a současně přetrvání protilátek proti CatACT [rodově specifické] (17) a FHA může být vyhodnoceno jako známka infekce způsobené *B. parapertussis*.

2. Princip testu

Proteiny *B. pertussis* se přenášejí speciální metodou rozstřívání na nitrocelulóзовou membránu. Nitrocelulóзовá membrána je potom rozstřívána na jednotlivé pásy. Po inkubaci vyčištěného séra s tímto pásky dochází k tvorbě imunokomplexů. V séru přetrvávajících protilátek s antigeny v proužcích na membráně.

Inkubace nitrocelulóзовých proužků nesoucích antigen se vzorky lidského séra/plazmy umožňuje prokázat stávající specifické protilátky. Po odstranění nenavázaného konjugátu promytím zviditelní se vytvořené imunokomplexy antigen-protilátka reakcí se substrátem, který působením enzymu vytváší modrofialové zbarvení proužků v místě lokalizace imunokomplexu. Reakce enzym-substrát se zastaví promytím nitrocelulóзовých pásek destilovanou vodou / deionizovanou vodou. Podle vytvořeného spektra proužků na membráně odpovídajících jednotlivým antigenům lze usuzovat na přetrvání specifických protilátek třídy IgG popř. IgA proti danému antigenům.

3. Obsah balení

3.1 Souprava pro 32 analýz

1. Nitrocelulóзовé testovací pásy IgG popř. IgA s antigeny, zesílené fólie, setříděné v sádku, připravené k použití	1x	32 pásek
2. Kontrola hraní (cutoff) IgG popř. IgA, lidské sérum, předem zředěný	1x	1,0 ml
3. Ředící roztok/promývací pufr, pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris	2x	50 ml
4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s koží protilátkou proti lidským IgG nebo IgA (100 x konc.) s konzervačním prostředkem	1x	0,7 ml
5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití	1x	57 ml
6. Protokol k záznamům a archivování výsledků	1x	1 kus

3.2 Souprava pro 96 analýz

1. Nitrocelulóзовé testovací pásy IgG popř. IgA s antigeny, zesílené fólie, setříděné v sádku, připravené k použití	3x	32 pásek
2. Kontrola hraní (cutoff) IgG popř. IgA, lidské sérum, předem zředěný	2x	1,0 ml
3. Ředící roztok/promývací pufr, pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris	4x	50 ml
4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s koží protilátkou proti lidským IgG nebo IgA (100 x konc.) s konzervačním prostředkem	3x	0,7 ml
5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití	3x	57 ml
6. Protokol k záznamům a archivování výsledků	3x	1 kus

K dodání na vyžádání:

IgG, popř. IgA- pozitivní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Vyhodnocení pozitivní pruhy > pruhy Cut off můžete zjistit z certifikátu, který je součástí dodávky.
(obj. -> IgG: WE116P60, popř. IgA: WE116P40)

IgG/IgA- negativní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Negativní kontrola nezobrazuje žádné pruhy, resp. žádné vyhodnocení relevantní pruhy > pruhy Cut off.
(obj. -> IgG/IgA: WE116N20)

4. Pře uchová vání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů

Testovací soupravu pře uchová váte pš 2 ađ 8°C. Upotřebitelnost jednotlivých složek je vyznač ena na jejich štítcích, upotřebitelnost soupravy (datum expirace- viz pšslužný certifikát o kontrole kvality).

1. Jednotlivé reagensie nenechte zmznout a nevystavujte je vysokým teplotám.
2. Reagensie nepoužívejte po uplynutí jejich data upotřebitelnosti.
3. Neponechávejte reagensie na pšmém světle.
4. Roztok substrátu BCIP/ NBT je citlivý na světlo a musí být pře uchová ván ve tmě.
5. **Nitroceluló zové testovací prás ky** po vyjmutí ze sá l ku ihned použijte. Sá l ek se zbylými pásky opě t pevně uzavř ete a pře uchová vajte pš teplotě 2 ađ 8°C. K archivaci výsledkř by mřly být nitroceluló zové testovací pásky bezpodmíneč nř chráně ny pšed pšmým sluneč ním světlem, aby se zabránilo jejich vyblednutí.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	nezšedlý	+2 ađ +8°C	1 týden
testovací proužky	po otevř ení	+2 ađ +8°C (skladování v souč asně dodaném sá l ku)	3 mříce
kontroly	po otevř ení	+2 ađ +8°C	3 mříce
konjugát	po otevř ení	+2 ađ +8°C	3 mříce
	zšedlý	+2 ađ +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevř ení	+2 ađ +8°C (chraňte pšed světlem)	3 mříce
prací roztok	po otevř ení	+2 ađ +8°C (chraňte pšed světlem)	3 mříce
	po zšednutí (přpravený k použití)	+2 ađ +8°C	4 týdny
	po zšednutí (přpravený k použití)	nebo pokojová teplota	2 týdny

5. Preventivní opatř ení a varovná upozorně ní

1. Jako kontrolní séra jsou využí vána pouze séra, která byla testována a šhledána negativně na protilátky proti HIV1/2 a HCV a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B.. Pšsto by mřla být kontrolní séra, vzorky, zšedlé vzorky, konjugáty a nitro-celuló zové testovací proužky považována za potenciálně infekč ní materiál a mřlo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí pšslužné smřnice pro práce v laboratoř ch..
2. Pš provádě ní imunoblotu je třeba použí vat jednorázové rukavice a pinzetu z umě le hmoty.
3. Likvidace použitého materiálu se uskuteč ňuje podle specifických smřnic platných v konkrétní zemi použití.
4. Inkubač ní vaně ky jsou výrobcem koncipovány pouze pro jedno použití. Vícenásobné použití třchto inkubač ních vaně ek je na zodpově dnosti uživatele. Pš event. vícenásobném použití doporuč ujeme inkubač ní vaně ky po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného, potom vyč istit a dřkladně vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou/demineralizovanou vodou.

6. Další potřebný materiál (není dodáván souč asně)

1. Inkubač ní vaně ky (v pšpadě potřeba lze objednat pod objednač ním ě íslem WE300.08)
2. Vertikální třpač ka, pšpadě s naklápně m (ne rotač ní!)
3. Promývací láhev
4. Pipeta nebo ruč ní promývač ka
5. Mikropipety 5 řl - 1500 řl
6. Řpil ky mikropipet
7. Zkumavky na vzorky ř objemu 2 - 20 ml
8. Pinzeta z umě le hmoty
9. Destilovaná voda nebo deionizovaná voda
10. Filtrač ní papír

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přítom není detegovatelný druh antikoagulantů), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

8. Provedení testu

Pro dosažení správných výsledků se musí přesně dodržovat pracovní předpis firmy VIROTECH Diagnostics.

8.1 Příprava vzorků

1. Na vzorek pacienta je zapotřebí 15 µl séra nebo plazmy.
2. Vzorky krve by měly být odebírány asepticky venepunkcí. Po úplné koagulaci je třeba sérum oddělit (u plazmy odpadá). Pro delší přechovávání musí být séra zmrazena na - 20°C.
3. Séra se nesmí opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.
4. Séra, která byla tepelně inaktivována nebo jsou lipemicky, hemolyticky nebo mikrobiálně kontaminována mohou vést k chybným výsledkům a neměla by být proto používána.
5. Nepoužívejte zakalená séra (zejména po roztání pokud byla zmrazená), popř. se zákal odstraní centrifugováním (5 minut při 1000 x g), i když supernatant odpipetujete a použijete při testu.

8.2 Příprava reagentů

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna činidla LINE v jednom testovacím cyklu se stejnými podmínkami inkubace a komponenty různých parametrů z různých řádů. Cut off kontroly se provádí podle parametrů a řádů.
2. Před zředěním koncentrovaných reagentů se musí vytemperovat na teplotu místnosti. Používejte pouze destilovanou vodu / deionizovanou vodu vysoké kvality a pracujte při teplotě místnosti.
3. Zředěné roztoky před použitím dobře promíchejte.
4. **Zředěný / promývací pufr**
Řešení roztok/promývací pufr je k dispozici v 10ti násobné koncentraci. Řešení roztok/promývací pufr se ředí v poměru 1:10 destilovanou nebo deionizovanou vodou (10ml/50ml/100ml koncentrátu + 90ml/450ml/900ml A. dest./deioniz.), dobře promíchat. Koncentrovaný i naředěný ředící/promývací pufr může vykazovat žluté zabarvení. Toto žluté zabarvení však nemá žádný vliv na trvanlivost a funkčnost ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **Konjugát IgG pro LINE**
Konjugát 1 + 100 naředěte finálním zředěným / promývacím puforem a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zředění konjugátu (bod: schéma přiblížení testu).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití.

8.3 Provedení testu Immunoblot

Pozor : Pro správné provedení a posouzení B. pertussis + CatACT LINE musí být při každém testu součástí provedena Cut off kontrola odpovídající parametrům a řádům.

**Pro spolehlivou diagnostiku Bordetella pertussis by měl být test LINE
proveden analýzou protilátek třídy IgG a IgA**

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom pásku do gélku i stejné inkubační vany. Pásky se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zředěný / promývací pufr** a vložte na testovací ku. Dbejte, aby nitrocelulózkové testovací pásy byly kapalinou pokryty stejným způsobem. Pásy nesmí být během celého provádění testu oschnout.
4. Zesílené nitrocelulózkové testovací pásy se během minuty zcela navlhčí a mohou být inkubovány v poloze zadní stranou dolů, přední stranou dolů nebo v poloze na stranu.

5. Na každých **15 µl séra/plazmy pacienta** i **100 µl pozitivní / negativní kontroly Cut off** pipetujte, pokud možno na horním, označeném konci proužku. Pacientovo sérum a kontrolu nechte **30 minut** inkubovat na **těpale** ce.. **PŠ** pipetování a následujícím odsávání dbejte na to, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci mezi vzorky.
6. Ze **glábků** zcela odsajte kapalinu nebo opatrně ji odlijte. **PŠ** odlévání kapaliny z **stanou** nitrocelulóзовé testovací pásky ulpěné na dně **glábků**. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.
7. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z **ředného** promývacího pufru na **těpale** ce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. **PŠ** dle ukončení posledního promytí **připravte** potřebné množství **prvního** **ředného** konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze **glábků** (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **ředného konjugátu** do **glábků** s pásky a inkubujte **30 minut** na **těpale** ce .
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze **glábků**.
11. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml **ředného** promývacího pufru na **těpale** ce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte . Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze **glábků** (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do **glábků** a nechte vyvíjet zbarvení na **těpale** ce **10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odlitím roztoku substrátu. Dále promyjte pásky bez další inkubace **3 x** vždy 1,5 ml **destilované nebo deionizované vody**.
15. Odlijte destilovanou nebo deionizovanou vodu a nechte pásky oschnout na **istém** filtračním papíře. Zbarvení pozadí, které lze pozorovat u vlhkých nitrocelulóзовých testovacích pásků, se u oschlých pásků zcela ztrácí. Zesílené nitrocelulóзовé testovací pásky vyžadují v porovnání s obvyklými nitrocelulóзовými testovacími pásky trochu více času, než oschnou.
16. Pro vyhodnocení používejte **připojený** vyhodnocovací protokol. Popis jednotlivých proužků na protokolu a **přímě** na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

8.4 Použití analyzátoru Immunoblot

9. Vyhodnocení testu

1. kontrolou séra

- ## 2. kontrolou konjugátu

Provedení testu je platné, pokud je na vyvolaných nitrocelulózových páscích zřetelně rozeznatelná jak kontrola séra tak i interní kontrola konjugátu.

9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů

pruhv IgG a IgA:

9.2 Použití hraní ní kontroly Cut off

Vyskytující se pásky	Hodnocení intenzity pásk
> Cut Off band (PT)	pozitivní (+)
= Cut Off band (PT)	hraniční (+/-)

< Cut-Off band (PT)	negativní (-)
---------------------	---------------

9.3 Význam antigenů

Seznam použitých i) genových antigenů *Bordetella pertussis* (nativní PT a FHA) a rekombinantních antigenů (CatACT) *Bordetella pertussis*, které pocházejí z kmene: Tohama Phase I.

Antigen / Označení	Význam antigenů	Specifita protilátek v LINE
PT 28kDa	Pertusový toxin (PT) je exotoxin, který se vyskytuje pouze u <i>B. pertussis</i> , a je proto vysoce specifický pro tohoto původce. Je tvořen enzymaticky aktivní podjednotkou A (subunit S1) a podjednotkou B vážící receptor. S ochrannou působí infekcí <i>B. pertussis</i> korelují nejvíce: součástí acelulární (nebuní) olovo kovací látky a protilátky proti PT v olovo kovacích sérech. Pro diagnostiku bordetel v IgG cestou jediného séra představuje PT antigen, která má nejvyšší senzitivitu a specifitu - v obou případech >98 %. Pertusový toxin může být proto považován za markerový protein infekce vyvolané <i>B. pertussis</i> . Pro IgA a IgM je odpověď protilátek proti PT přibližně pouze v přibližně 40-50 % případů (4, 5).	Vysoce specifické pro <i>B. pertussis</i>
CatACT 43kDa	Adenylácykloxykinázový toxin (ACT) je antigen, který se nevyskytuje v olovo kovacích látkách proti <i>B. pertussis</i> . Jde o zásadní (esenciální) faktor virulence <i>B. pertussis</i> (6). Zkoušená reaktivita celkového proteinu ACT s i) leny rodiny toxinů RTX - včetně hemolysinu <i>E.coli</i> (7, 8, 9,10) - jimž však chybí enzymatická jednotka adenylát cyklázy, je všeobecně známa. Z tohoto důvodu používá <i>B. pertussis</i> + CatACT LINE pouze N-terminální část ACT antigenu (označovanou jako CatACT) o délce 400 AS (aminokyselin), která obsahuje katalytickou doménu, která je pro <i>Bordetella sp.</i> specifická. CatACT je pro IgG nejlepším infekčním markerem pro serologickou diagnostiku, který není ovlivněn olovo kovacím statusem. V době diagnózy bylo 68,0% kulturně pozitivních pacientů v IgG seropozitivních pro CatACT. Ukázalo se, že CatACT je po PT druhým nejsenzitivnějším markerem. (11) Proto se přibližuje souhlasný důkaz protilátek proti CatACT a PT existenci akutní nebo nedávno prodělané infekce.	Specifické pro <i>Bordetella</i>
FHA 220kDa	Filamentózní Hemagglutinin (FHA) je povrchový protein <i>Bordetella pertussis</i> . Slouží zárodku jako důležitý adhezín (4). Odpověď protilátek na FHA je obzvláště v IgG hodnotou přibližně 80-90% velmi vysoká; v IgA a IgM i) ní přibližně 50-60% (4, 5). Mezitím mohlo být na základě několika nezávislých studií (3, 12, 13) ukázáno, že křídlová reaktivita FHA <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> mimo jiné je k dispozici bakteriálním zárodkům.	Málo specifické

9.4 Kritéria vyhodnocení

Interpretace serologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologické údaje a další laboratorní nálezy, které jsou k dispozici.

Doporučené posouzení IgG a IgA

PT	CatACT	Význam	Interpretace <i>B. pertussis</i>
-	- +/- +	Čádné upozornění na infekci <i>Bordetella pertussis</i> . Možná známka svědčící o infekci <i>B. parapertussis</i> (viz níže)	Negativní
+/-	- +/- +	Může být dána možnost velmi rané nebo již delší infekce <i>B. pertussis</i> . Doporučuje se prověření pomocí druhého séra.	Hraniční

+	-	Upozornění na 1. erstvou nebo nedávno prodídanou infekci <i>Bordetella pertussis</i> . Zkontrolujte stav o1 kování	Pozitivní
+	+/- +	Významné upozornění na 1. erstvou nebo nedávno prodídanou infekci <i>Bordetella pertussis</i> .	

Další známka infekce *B. parapertussis* v IgG u IgA:

PT	CatACT	FHA	Význam	Interpretace <i>B. pertussis</i>
-	+/- +	+	možná známka infekce <i>B. parapertussis</i>	Negativní

Pozitivní výsledek na CatACT a FHA může být pš chybní odpovědi PT interpretován jako známka infekce *B. parapertussis*.

K potvrzení podezření na infekci *B. parapertussis* doporučujeme otestovat o 7 dnů později druhé sérum; v tomto nesmí být nadále prokazatelné žádné protilátky proti PT. Alternativně je možno provést PCR na *B. parapertussis*.

FHA pruh (band): Samotný výskyt protilátek proti nespecifickému skupinovému antigenu FHA nedovoluje žádný závěr, zda se jedná o infekci způsobenou *Bordetella pertussis* nebo *Bordetella parapertussis*. V tomto případě by se mohlo také jednat o zkšženou reakci FHA s *Haemophilus influenzae* nebo jinými pŕvodci, nebo o pšetrávající protilátky (o1 kovací protilátky nebo protilátky po dšve prodídané infekci). Pš otázkách týkajících se sérologických výsledků z hlediska *Bordetella*, které zohledňují FHA, je možno hodnotit také FHA pruh v LINE, viz *B. parapertussis*. K tomuto účelu se posuzuje FHA pruh pomocí intenzity pruhu PT cut off kontroly:

➤ Cut off: pozitivní / = Cut off: hraní ní / < Cut off: negativní

Upozornění:

Protilátky IgA a IgM se nevytváší vždycky a jsou tudíž trochu méně spolehlivým markérem infekce *Bordetella pertussis* než protilátky IgG.

9.5 Omezení testu

1. Negativní výsledek testu Blot pšesto zcela nevylučuje možnost infekce vyvolané bakteriemi *Bordetella pertussis*. Vzorek mohl být odebrán pšed vznikem protilátek nebo titr protilátek leží pod prŕkazní hranicí tohoto testu.
2. Z trvalé pštomnosti nebo nepštomnosti protilátek nelze 1. nit závěry o úspěchu nebo neúspěchu použité terapie.
3. Na základě vřdího pŕ tu nezávislých studií bylo prokázáno, že existuje zkšžená reaktivita FHA pŕvodem od *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* a dalších pŕvodců (3, 12, 13, 21).
4. V málo 1. etných případech mohou séra pacientů vykazovat řinverzní pŕoušky (tmavé pozadí, bílé pŕoušky); tyto nemohou být vyhodnocovány, to znamená že test Immunoblot nelze v těchto případech vyhodnotit. Sérum by mělo být vyšetřeno jinými sérologickými metodami.

10. Literatura

1. Wirsing von König et al., 1999, Evaluation of a single-Sample Serological Technique for Diagnosing Pertussis in Unvaccinated Children, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, (18)341-345.
2. Wiersbitzky, S., Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt, Therapiewoche 25 (1995), S.1485 ř 1486.
3. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259.
4. Tiller, F-W.; Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, Apr,1997.
5. Bruce D. Meade, Chrisanna M. Mink, and Charles R. Manclark. 1994. Serodiagnosis of Pertussis, Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.
6. Weingart, C. L., and A. A. Weiss. 2000. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. Infect. Immun. 68:1735ř 1739.

7. Arciniega, J. L., E. L. Hewlett, K. M. Edwards, and D. L. Burns. 1993. Antibodies to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in neonatal and maternal sera. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 6:325-330.
8. Carlsson et al., Nov 1999, Acquisition of serum antibodies against filamentous hemagglutinin and pertactin unrelated to *Bordetella pertussis* infection., *Clin Microbiol Infect.*, (5)709-712.
9. Bauer, M. E., and R. A. Welch. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 64:167-175.
10. Chart, H., S. M. Scotland, and B. Rowe. 1989. Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157:H7 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 27:285-290.
11. Lee, S. J., M. C. Gray, L. Guo, P. Sebo, and E. L. Hewlett. 1999. Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.* 67:2090-2095.
12. Alison A. Weiss et al., Characterization of Serological Responses to Pertussis, *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, Mar. 2006, p341-348.
13. Bergfors et al., Juli 1999, Parapertussis and Pertussis: Differences and Similarities in Incidence, Clinical course, and Antibody Responses, *Int J Infect Dis*, 3(3):140-146.
14. Carlsson et al., Nov 1999, Acquisition of serum antibodies against filamentous hemagglutinin and pertactin unrelated to *Bordetella pertussis* infection., *Clin Microbiol Infect.*, (5)709-712.
15. Epidemiologisches Bulletin, 1/9: 1-4, Robert Koch Institut (RKI), Populationsimmunität gegen Diphtherie und Pertussis.
16. Hallander, Microbiological and Serological Diagnosis of Pertussis, *Clinical Infectious Diseases* 1999;28 (Suppl.2):99-106.
17. Mastrantonio et al., 1997, Antibody kinetics and long-term sero-prevalence in the Italian clinical trial of acellular pertussis vaccines, *Dev Biol Stand.*, (89): 275-278.
18. Watanabe, M., B. Connelly, and A. A. Weiss. 2006. Characterization of serological responses to pertussis. *Clinical and vaccine immunology* 13:341-8.
19. Weston, W., M. Messier, L. R. Friedland, X. Wu, and B. Howe. 2011. Persistence of antibodies 3 years after booster vaccination of adults with combined acellular pertussis, diphtheria and tetanus toxoids vaccine. *Vaccine*. Elsevier Ltd 29:8483-6.
20. Dragsted, D. M., B. Dohn, J. Madsen, and J. S. Jensen. 2004. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *Journal of medical microbiology* 53:749-54.
21. Hallander, H. O., J. Gnarpe, H. Gnarpe, and P. Olin. 1999. *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and persistent cough in children. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 31:281-286.
22. Baughman, A. L., K. M. Bisgard, K. M. Edwards, D. Guris, M. D. Decker, K. Holland, B. D. Meade, and F. Lynn. 2004. Establishment of Diagnostic Cutoff Points for Levels of Serum Antibodies to Pertussis Toxin, Filamentous Hemagglutinin, and Fimbriae in Adolescents and Adults in the United States. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11:1045-1053.

11. Schéma provedení testu

Provedení testu

inkubace vzorků	30 minut	15 µl séra/plazmy pacienta/100 µl kontroly v každém 1,5 ml zředěného / pracího pufru.
promývání	3 x 5 minut	1,5 ml zředěného / promývacího pufru
inkubace s konjugátem	30 minut	1,5 ml p zředěného konjugátu (1 + 100)
promývání	3 x 5 minut 1 x 1 minuta	1,5 ml zředěného / promývacího pufru destilovanou / deionizovanou vodou
inkubace se substrátem	10 ± 3 minut	1,5 ml roztoku substrátu
zastavení vývoje barvy	3 x bez meziinkubace	1,5 ml destilované / deionizované vody

Tabulka ředění konjugátu : (zaokrouhleno)

poloet proužek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zředěný / promývací pufr	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Koncentrovaný konjugát	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
konečný objem	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

poloet proužek	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
zředěný / promývací pufr	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Koncentrovaný konjugát	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
konečný objem	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

poloet proužek	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
zředěný / promývací pufr	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Koncentrovaný konjugát	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
konečný objem	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

poloet proužek	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
zředěný / promývací pufr	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Koncentrovaný konjugát	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
konečný objem	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml