

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
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com



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. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů	4
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není dodáván současně)	4
7. Vyšetřovaný materiál	5
8. Provedení testu	5
8.1 Příprava vzorků	5
8.2 Příprava reagensů	5
8.3 Provedení testu Imunoblot	5
8.4 Použití analyzátoru Imunoblot	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, popřípadě IgA proti bakteriím *Bordetella pertussis* v lidském séru. Kit slouží k rozpoznání čerstvé, nedávné nebo před delší dobou prodělané infekce *Bordetella pertussis* nebo k diferenciální diagnostice delší dobu trvajících klinických manifestací s necharakteristickým kašlem. Na základě současného průkazu specifických protilátek proti pertusovému toxinu (PT) a katalytické části toxinů adenylát cyklázy (CatACT) může být ve většině případů usnadněno rozlišení infekce *Bordetella pertussis* a očkování.

Line Immunoblot může dále ukázat na možnost přítomnosti infekce *B. parapertussis*. Absence specifických protilátek proti PT při současné přítomnosti 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 rozstříkávání na nitrocelulóзовou membránu. Nitrocelulóзовá membrána je potom rozstříhávána na jednotlivé pásy. Po inkubaci vyšetřovaného séra s těmito pásy dochází k tvorbě imunokomplexů. v séru přítomných protilátek s antigeny v prouzcích 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 vytváří modrofialové zbarvení proužků v místě lokalizace imunokomplexu. Reakce enzym-substrát se zastaví promytím nitrocelulóзовých pásků destilovanou vodou / deionizovanou vodou. Podle vytvořeného spektra proužků na membráně, odpovídajících jednotlivým antigenům lze usuzovat na přítomnost specifických protilátek třídy IgG popřípadě IgA proti těmto antigenům.

3. Obsah balení

3.1 Souprava pro 32 analýz

1. Nitrocelulóзовé testovací pásy IgG popř. IgA s antigeny, zesílené fólií, setříděné v sešitku, připravené k použití	1x	32 pásků
2. Kontrola hraniční (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 kozí 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 fólií, setříděné v sešitku, připravené k použití	3x	32 pásků
2. Kontrola hraniční (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 kozí 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.-č.: 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.-č.: IgG/IgA: WE116N20)

4. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů

Testovací soupravu přechováváte při 2 až 8°C. Upotřebitelnost jednotlivých složek je vyznačena na jejich štítcích, upotřebitelnost soupravy (datum expirace- viz příslušný certifikát o kontrole kvality).

1. Jednotlivé reagensie nenechte zmraznout a nevystavujte je vysokým teplotám.
2. Reagensie nepoužívejte po uplynutí jejich data upotřebitelnosti.
3. Neponěchávejte reagensie na přímém světle.
4. Roztok substrátu BCIP/ NBT je citlivý na světlo a musí být přechováván ve tmě..
5. **Nitrocelulózové testovací proužky** po vyjmutí ze sáčku ihned použijte. Sáček se zbylými pásky opět pevně uzavřete a přechováváte při teplotě 2 až 8°C. K archivaci výsledků by měly být nitrocelulózové testovací pásky bezpodmínečně chráněny před přímým slunečním světlem, aby se zabránilo jejich vyblednutí.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
testovací proužky	po otevření	+2 až +8°C (skladování v současně dodaném sáčku)	3 měsíce
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +8°C	4 týdny
	po zředění (připravený k použití)	nebo pokojová teplota	2 týdny

5. Preventivní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra jsou využívána pouze séra, která byla testována a shledána negativní na protilátky proti HIV1/2 a HCV a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B.. Přesto by měla být kontrolní séra, vzorky, zředěné vzorky, konjugáty a nitro-celulózové testovací proužky považována za potenciálně infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práce v laboratořích..
2. Při provádění imunoblotu je třeba používat jednorázové rukavice a pinzetu z umělé hmoty.
3. Likvidace použitého materiálu se uskutečňuje podle specifických směrnic platných v konkrétní zemi použití.
4. Inkubační vaničky jsou výrobcem koncipovány pouze pro jedno použití. Vícenásobné použití těchto inkubačních vaniček je na zodpovědnosti uživatele. Při event. vícenásobném použití doporučujeme inkubační vaničky po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného, potom vyčistit a důkladně vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou/demineralizovanou vodou.

6. Další potřebný materiál (není dodáván současně)

1. Inkubační vaničky (v případě potřeby lze objednat pod objednacím číslem WE300.08)
2. Vertikální třepačka, případně s naklápěním (ne rotační!)
3. Promývací láhev
4. Pipeta nebo ruční promývačka
5. Mikropipety 5 µl - 1500 µl
6. Špičky mikropipet
7. Zkumavky na vzorky objemu 2 - 20 ml
8. Pinzeta z umělé hmoty
9. Destilovaná voda nebo deionizovaná voda
10. Filtrační papír

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý 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), popřípadě se zákal odstraní centrifugováním (5 minut při 1000 x g), čirý supernatant odpipetujte a použijte při testu.

8.2 Příprava reagensů

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna činidla LINE v jednom testovacím cyklu se stejnými časy inkubace a komponenty různých parametrů z různých šarží. Cut off kontroly se provádějí podle parametrů a šarže.
2. Před zředěním koncentrovaných reagensů 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. **Zředovací / promývací pufr**
Ředící roztok/promývací pufr je k dispozici v 10ti násobné koncentraci. Ředící 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 zabarevení. Toto žluté zabarvení však nemá žádný vliv na trvanlivost a funkčnost ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **Konjugát IgG popř. IgA**
Konjugát 1 + 100 naředíte finálně zředěným zředovacím / promývacím pufr a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zředění konjugátu (bod: „Schéma průběhu testu“).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití..

8.3 Provedení testu Imunoblot

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

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

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom pásku do zlábků čisté inkubační vaničky. Pásky se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zředovací / promývací pufr** a vložte na třepačku.. Dbejte, aby nitrocelulózkové testovací pásky byly kapalinou pokryty rovnoměrně. Pásky nesmějí během celého provádění testu oschnout.
4. Zesílené nitrocelulózkové testovací pásky se během minuty zcela navlhčí a mohou být inkubovány v poloze zadní stranou dolů, přední stranou dolů nebo v poloze na straně.

5. Na každých **15µl séra/plazmy pacienta** či **100µl pozitivní / negativní kontroly Cut off** pipetujte, pokud možno na horním, označeném konci proužku. Pacientovo sérum a kontrolu nechte **30 minut** inkubovat na třepačce.. Při pipetování a následujícím odsávání dbejte na to, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci mezi vzorky.
6. Ze žlábků zcela odsajte kapalinu nebo opatrně ji odlijte. Při odlévání kapaliny zůstanou nitrocelulóзовé testovací pásky ulpělé na dně žlábků. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.
7. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Před ukončením posledního promytí připravte potřebné množství čerstvého zředěného konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **zředěného konjugátu** do žlábků s pásky a inkubujte **30 minut** na třepačce .
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků.
11. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte . Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do žlábků a nechte vyvíjet zbarvení na **třepačce 10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odlištěm 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 čistém filtračním papíře. Zabarvení 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 páskými trochu více času, než oschnou.
16. Pro vyhodnocení používejte připojený vyhodnocovací protokol. Popis jednotlivých proužků na protokolu a přímo na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

Schéma provedení testu viz poslední stránku

8.4 Použití analyzátoru Imunoblot

Pro automatické zpracování Blot a LINE jsou schváleny tyto přístroje: Apollo a Profiblot. V zásadě jsou vhodné všechny automaty Blot obvyklé na trhu.

9. Vyhodnocení testu

Je spolehlivému vyhodnocení je každý z pásků LINE vybaven dvěma kontrolami :

1. kontrolou séra

Pouze po inkubaci se sérem pacienta se pod označovací linií objeví pruh inkubace séra.

2. kontrolou konjugátu

Pásek LINE je vybaven kontrolním pásem konjugátu, který se zobrazí po inkubaci s odpovídajícím konjugátem.

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

Polohu kontrolního pásku séra a konjugátu najdete na protokolu..

9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů

Polohu a označení reakčních pruhů zjistíte v protokolovacím listu.

pruhy IgG a IgA: FHA, CatACT, PT

9.2 Použití hraniční kontroly Cut off

Intenzita pásků PT kontroly Cut off slouží k semikvantitativnímu posouzení všech vyskytujících se pásků:

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

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

9.3 Význam antigenů

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

Antigen / Označení	Význam antigenů	Specifičnost 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 před infekcí <i>B. pertussis</i> korelují nejvíce: součást acelulární (nebuněčné) očkovací látky a protilátky proti PT v očkovacích 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 ad IgM je odpověď protilátek proti PT přítomna pouze v přibližně 40-50 % případů černého kašle (4, 5).	Vysoce specifické pro <i>B. pertussis</i>
CatACT 43kDa	Adenylátcyklasový toxin (ACT) je antigen, který se nevyskytuje v očkovacích látkách proti <i>B. pertussis</i> . Jde o zásadní (esenciální) faktor virulence <i>B. pertussis</i> (6). Zkřížená reaktivita celkového proteinu ACT s členy 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 markérem pro serologickou diagnostiku, který není ovlivněn očkovacím statusem. V době diagnózy bylo 68,0% kulturně-pozitivních pacientů v IgG seropozitivních pro CatACT. Ukázalo se, že CatACT je po PT druhým nejsenzitivnějším markérem. (11) Proto se přibližuje současný důkaz protilátek proti CatACT a PT existenci akutní nebo nedávno prodělané infekci.	Specifické pro <i>Bordetella</i>
FHA 220kDa	Filamentózní Hemagglutinin (FHA) je povrchový protein <i>Bordetella pertussis</i> . Slouží zárodku jako důležitý adhezin (4). Odpověď protilátek na FHA je obzvláště v IgG hodnotou přibližně 80-90% velmi vysoká; v IgA a IgM činí přibližně 50-60% (4, 5). Mezitím mohlo být na základě několika nezávislých studií (3, 12, 13) ukázáno, že křížová 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>
-	- +/- +	Žádné 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 čerstvou nebo nedávno prodělanou infekci <i>Bordetella pertussis</i> . Zkontrolujte stav očkování	Pozitivní
+	+/- +	Významné upozornění na čerstvou nebo nedávno prodělanou 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 při chybějící 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 zkříženou reakci FHA s *Haemophilus influenzae* nebo jinými původci, nebo o přetrvávající protilátky (očkovací protilátky nebo protilátky po dříve prodělané infekci). Při 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: hraniční / < Cut off: negativní

Upozornění:

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

9.5 Omezení testu

1. Negativní výsledek testu Blot přesto zcela nevylučuje možnost infekce vyvolané bakteriemi *Bordetella pertussis*. Vzorek mohl být odebrán před vznikem protilátek nebo titr protilátek leží pod průkazní hranicí tohoto testu.
2. Z trvalé přítomnosti nebo nepřítomnosti protilátek nelze činit závěry o úspěchu nebo neúspěchu použité terapie.
3. Na základě většího počtu nezávislých studií bylo prokázáno, že existuje zkřížená reaktivita FHA původem od *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* a dalších původců (3, 12, 13, 21).
4. V málo četných případech mohou séra pacientů vykazovat "inverzní" proužky (tmavé pozadí, bílé proužky); 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 – 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. 68:1735–1739.

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. 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.
8. Bauer, M. E., and R. A. Welch. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 64:167–175.
9. 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.
10. 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.
11. Alison A. Weiss et al. Characterization of Serological Responses to Pertussis, *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, Mar. 2006, p341-348.
12. 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.
13. 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.
14. Epidemiologisches Bulletin, 1/9: 1-4, Robert Koch Institut (RKI), Populationsimmunität gegen Diphtherie und Pertussis.
15. Hallander, Microbiological and Serological Diagnosis of Pertussis, *Clinical Infectious Diseases* 1999;28 (Suppl.2):99-106.
16. 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.
17. Watanabe, M., B. Connelly, and A. A. Weiss. 2006. Characterization of serological responses to pertussis. *Clinical and vaccine immunology* 13:341-8.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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 zředovacího/pracího pufru.
promývání	3 x 5 minut	1,5 ml zředovacího / 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 zředovacího / 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 : (zaokrouhleně)

počet proužků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zředovací / 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

počet proužků	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
zředovací / 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

počet proužků	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
zředovací / 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

počet proužků	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
zředovací / 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