

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgG LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-32)

Uğsakymo Nr.: WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

Uğsakymo Nr.: WE116G96

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgA LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-32)

Uğsakymo Nr.: WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

Uğsakymo Nr.: WE116A96

TIK IN VITRO DIAGNOSTIKAI

VIROTECH Diagnostics GmbH

Löwenplatz 5

D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0

Faksas: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 30.10.2018

REV 5 / VIROTECH B. pertussis + CatACT IgA & IgG LINE Immunoblot LT

Turiny

1. Naudojimo paskirtis	3
2. Testo veikimo principas.....	3
3. Pakuotės turinys	3
3.1 Rinkinys 32 nustatymams	3
3.2 Rinkinys 96 nustatymams	3
4. Testavimo rinkinio ir reagentų laikymas ir tinkamumo laikas.....	4
5. Atsargumo priemonės ir papildamosios nuorodos	4
6. Papildomai reikalingos medžiagos (neįtrauktos į komplektaciją)	4
7. Tiriamoji medžiaga.....	5
8. Testo atlikimas	5
8.1 Mėginių paruošimas	5
8.2 Reagentų paruošimas	5
8.3 Imunobloto testo atlikimas.....	5
8.4 Imunobloto procesorių naudojimas	6
9. Testo vertinimas.....	6
9.1 Paciento mėginių vertinimas	6
9.2 Ribinės vertės kontrolės naudojimas	6
9.3 Antigeno reikšmė.....	7
9.4 Vertinimo kriterijai	7
9.5 Testo ribos	8
10. Literatūra	8
11. Testavimo schema	10

1. Naudojimo paskirtis

LINE imunobloto testavimo rinkinys naudojamas kokybiniam *Bordetella pertussis* specifiniui IgG ar IgA antikūnų nustatymui žmogaus serume. Rinkinys skirtas gyviejiems, neseniai ar prieš ilgą laiką persirgtai *Bordetella pertussis* infekcijai atpažinti arba diferencinei ilgiau trunkančiai klinikinei manifestacijai su necharakteringu kosuliu diagnostikai. Kadangi vienu metu nustomi specifiniai prieš kokiui toksiną (PT) ir katalitinį adenilato ciklazės toksino (CatACT) dalinukreipti antikūnai, dauguma atveju galima lengviau atskirti *Bordetella pertussis* infekciją nuo skiepų.

Be to, LINE imunoblotos gali pateikti nuorodą žalingai *B. paraptussis* infekcijai. Specifiniui prieš PT nukreipti antikūnų nebuvimas, tuo pat metu esant antikūnams prieš CatACT [specifinio rėgio] (17) ir FHA, gali būti vertinamas kaip nuoroda į *paraptussis* infekciją.

2. Testo veikimo principas

Specialiu metodu *B. pertussis* proteinai ugpurškiami ant nitroceliuliozės membranos. Tada nitroceliuliozės membrana supjaustoma atskiromis juostelėmis.

Inkubuojant antigenų padengtas nitroceliuliozės juosteles su žmogaus serumo (plazmos) mėginiais galima nustatyti specifinius antikūnų buvimą. Gie antikūnai sudaro imuninius kompleksus su ant testavimo juostelių fiksuotais antigenais. Plovimo etapais pašalinus nesurištus antikūnus, atskiros nitroceliuliozės juostelės su garminė fosfataze konjuguotais prieš žmogų nukreiptais IgG ar IgA antikūnais inkubuojamos. Kito plovimo etapo metu pašalinus nesurištus konjuguotus antikūnus, antigeno-antikūno kompleksai (surišti antikūnai) padaromi matomais pridodant nedaugto substrato, kuris jo fermentinės reakcijos metu sudaro mėlynai violetines spektro juostas (antigeno spektro juostas). Fermento (substrato) reakcija sustabdoma plaunant nitroceliuliozės juosteles dist. (dejonizuotu) vandeniu. Priklausomai nuo stebimos spektro juostų struktūros galima daryti išvadas apie specifinių IgG ar IgA antikūnų buvimą.

3. Pakuotės turinys

3.1 Rinkinys 32 nustatymams

- | | | |
|--|-----------|--------------|
| 1. IgG ar IgA nitroceliuliozės testavimo juostelės su ugpurškytu antigenu, sustiprintos plėvele, surišti į juotos paketėliuose, paruoštos naudoti | 1x | 32 juostelės |
| 2. IgG ar IgA ribiniui verli i kontrolė, žmogaus serumas, praskiestas | 1x | 1,0 ml |
| 3. Skiedimo (plovimo) buferis , pH 7,3 (10x konc.), su trisfif konservantu | 2x | 50 ml |
| 4. IgG ar IgA konjugatas (100x konc.) prieš žmogų (oškų) garminė fosfatazė, su konservantu | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substratas (BCIP/NBT), paruoštas naudoti | 1x | 57 ml |
| 6. Vertinimo protokolo lapas rezultatams protokoluoti ir archyvuoti | 1x | 1 vnt. |

3.2 Rinkinys 96 nustatymams

- | | | |
|--|-----------|--------------|
| 1. IgG ar IgA nitroceliuliozės testavimo juostelės su ugpurškytu antigenu, sustiprintos plėvele, surišti į juotos paketėliuose, paruoštos naudoti | 3x | 32 juostelės |
| 2. IgG ar IgA ribiniui verli i kontrolė, žmogaus serumas, praskiestas | 2x | 1,0 ml |
| 3. Skiedimo (plovimo) buferis , pH 7,3 (10x konc.), su trisfif konservantu | 4x | 50 ml |
| 4. IgG ar IgA konjugatas (100x konc.) prieš žmogų (oškų) garminė fosfatazė, su konservantu | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substratas (BCIP/NBT), paruoštas naudoti | 3x | 57 ml |
| 6. Vertinimo protokolo lapas rezultatams protokoluoti ir archyvuoti | 3x | 1 vnt. |

Pasiteiravus galima nustyti papildomai:

IgG ar IgA teigiama kontrolė, žmogaus serumas, praskiestas, 0,5 ml.

Teigiamos spektro juostos > ribiniui verli i spektro juostas nurodytos kartu pristatomame sertifikate.

(Ušakymo Nr.: IgG: WE116P60 ar IgA: WE116P40)

IgG / IgA neigiama kontrolė, žmogaus serumas, praskiestas, 0,5 ml.

Neigiamos kontrolās nerodo joki. Arba rodo netinkamas vertimai > ribines vertās spektro juostas.
(Uģsak. Nr.: IgG/IgA: WE116N20)

4. Testavimo rinkinio ir reagentų laikymas ir tinkamumo laikas

Testavimo rinkinį laikyti 2 iki 8 °C. Atskirti komponentų tinkamumo laikas nurodytas atitinkamoje etiketėje; rinkinio tinkamumo laiką nęgr. kokybās kontrolās sertifikate.

1. Atskirti reagentų negalima uęgdalyti ir juos reikia saugoti nuo aukętos temperatęros poveikio.
2. Reagentų nenaudoti pasibaigus tinkamumo laikui.
3. Stenkitās nelaikyti reagentų skaisę ioje ģviesoje.
4. BCIP/ NBT substrato tirpalas yra jautrus ģviesai ir jį reikia laikyti tamsoje.
5. **Nitroceliuliozās testavimo juostelās:** Ięėmęnį ięė maigelio juosteles tuojau pat naudokite. Maigeldų nereikalingomis juostelėmis vėl tvirtai uęgdarykite ir laikykite 2 iki 8 °C temperatęroje. Rezultatų archyvavimui nitroceliuliozās testavimo juosteles, kad spektro juostas neęgblyktų, bęė tinai reikia saugoti nuo tiesioginių saulės spindulių.

Medęgiaga	Bęė sena	Laikymas	Tinkamumo laikas
Tiriamieji męėginiai	neskiesti	+2 iki +8 °C	1 savaitę
Testavimo juostelės	atidarius	+2 iki +8 °C (laikyti kartu tiekiamame maigelyje)	3 męėnesiai
Kontrolās	atidarius	+2 iki +8 °C	3 męėnesiai
Konjugatas	atidarius	+2 iki +8 °C	3 męėnesiai
	praskiestas	+2 iki +8 °C	apie 6 h
Substratas	atidarius	+2 iki +8 °C (tamsioje vietoje)	3 męėnesiai
Ploviklis	atidarius	+2 iki +8 °C (tamsioje vietoje)	3 męėnesiai
	galutinai praskiestas (paruoęėtas naudojimui)	+2 iki +8 °C	4 savaitės
	galutinai praskiestas (paruoęėtas naudojimui)	arba patalpų temperatęroje	2 savaitės

5. Atsargumo priemonės ir dėėjamosios nuorodos

1. Kaip kontroliniai serumai naudojami tik serumai, kurie buvo patikrinti ir diagnozuoti kaip neigiami HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK ir hepatito B paviręinio antigeno poęėrių. Nepaisant to, kontrolinius serumus, męėginius, atskiestus męėginius, konjugatus ir nitroceliuliozās juosteles reikia laikyti potencialiai infekcinėmis medęgiagomis ir elęgtis su jomis atitinkamai atsargiai. Galioja atitinkamos laboratorijos darbo taisyklės.
2. Atliekant imunobloto tyrimų reikia męė vęėti vienkartinėmis piręėtinėmis ir naudoti plastikinius pincetęs.
3. Naudotos medęgiagos utilizuojamos pagal ģalyje galiojanęias direktyvas.
4. Inkubavimo vonelės gamintojas numatęė tik vienkartiniam naudojimui. Jeigu jos naudojamos pakartotinai, tai yra vien tik naudotojo atsakomybę. Jeigu jos bęė tų naudojamos keletę kartų mes rekomenduojame inkubavimo vonelės po naudojimo keletę valandų dezinfekuoti 1 % natrio hipochlorido tirpale, ięėvalyti ir kruopęėiai nuplauti vandentiekio vandeniu bei nuskalauti dist. (dejonizuotu) vandeniu.

6. Papildomai reikalingos medęgiagos (ne dėėja dėėjimo komplektaciję)

1. Inkubavimo vonelę (prireikus galima dėęyti uęėsak. Nr. WE300.08)
2. Purtytuvas (vertikalus, ne centrifuginis)
3. Plovyklę sustabdymui
4. Pipetę arba rankinis plautuvas
5. 5 μl 1500 μl mikropipetės
6. Pipetę ięėantgaliai
7. 2 iki 20 ml tęėrio męėgintuvęėliai (vamzdiniai)

8. Plastikinis pincetas
9. Dist. arba dejonizuotas vanduo
10. Filtravimo popierius

7. Tiriamoji medžiaga

Kaip tiriamoji medžiaga gali būti naudojamas serumas ir plazma (Jei antikoagulantų rūšis nėra svarbi), nors šiame informaciniame lapelyje ir kalbama tik apie serumą.

8. Testo atlikimas

Kad gautumėte teisingus rezultatus, būtinai tiksliai laikykitės VIROTECH Diagnostics darbo taisyklių.

8.1 Mėginių paruošimas

1. Vieno paciento mėginiui reikia 15 µl serumo arba plazmos.
2. Kraujo mėginiai turi būti paimti iš venos aseptiškai švariomis. Visiškai sukrėjęs reikia atskirti serumą (nereikia plazmos atveju). Ilgesniam laikymui serumus reikia užšaldyti -20 °C temperatūroje.
3. Stenkitės negaldyti ir neatitirpinti serumo keletą kartų.
4. Kągiu įgaktvintų lipeminių hemolizuotų arba mikrobiologiškai užtergtų serumų rezultatai gali būti neteisingi, todėl tokių serumų reikėtų naudoti.
5. Nenaudokite drumstų serumo mėginių (ypač atitirpintų), prireikus juos centrifuguokite (5 min prie 1000 x g), pipete surinkite skaidrų skystį ir naudokite testavimui.

8.2 Reagentų paruošimas

1. Taikantis prie laboratorijos rutinos visus LINE testus galima sujungti vieną testavimo ciklą su vienoda inkubavimo trukme ir reagentų komponentais. Ribinės vertės kontrolės naudojamos specialios pagal parametrus ir partijas.
2. Prieš skieddami atitinkamus visų testavimo reagentų koncentratų sugildykite iki patalpų temperatūros. Naudojant aukštesnę kokybę ir patalpų temperatūrą dist. (dejonizuotą) vandenį.
3. Prieš pradėdami testuoti skiedinius gerai išmaišykite.
4. **Skiedimo (plovimo) buferis**
Skiedimo (plovimo) buferis yra 10 kartų koncentruotas. Skiedimo (plovimo) buferio koncentratą 1:10 atskieskite distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu (10 ml / 50 ml / 100 ml koncentrato + 90 ml / 450 ml / 900 ml dist. (dejonizuoto) v.), gerai sumaišykite.
Ir koncentruotas, ir praskiestas skiedimo (plovimo) buferis gali būti tiek gelsvas. Ši gelsva spalva neturi jokios reikšmės nei skiedimo (plovimo) buferio tinkamumo laikui, nei testavimo ciklo veikimui ir diagnostiniam patikimumui.
5. **IgG ar IgA konjugatas**
Konjugatą 1 + 100 praskieskite galutinai atskiestu skiedimo (plovimo) buferiu, gerai išmaišykite. Vienam serumo mėginiui reikia 1,5 ml paruošto naudoti konjugato tirpalo. Žr. konjugato skiedimo lentelę (punktą 4.1 testavimo schema).
6. **Substrato tirpalas**
Substrato tirpalas pristatomas paruoštas naudoti.

8.3 Imunobloto testo atlikimas

Dėmesio! Kad AB. pertussis + CatACT LINE tyrimas būtų atliekamas ir vertinamas teisingai, kiekviename testavimo cikle būtina kartu vykdyti ir parametrus ir partijai specialiai ribiniams kontrolėms.

**Patikimai Bordetella pertussis diagnostikai LINE reikėtų atlikti
IgG ir IgA aspektu.**

1. Testas atliekamas patalpų temperatūroje.
2. Kiekvienam mėginiui du kartus inkubavimo vonelės lataką užpildykite po 1 juostelę. Juosteles stenkitės imti tik už pažymėto virgutinio galo.
3. Pipete užpildykite po 1,5 ml paruošto naudoti **skiedimo (plovimo) buferio** ir pastatykite ant purtytuvo. Atkreipkite dėmesį, kad nitroceliuliozės juostelės būtų tolygiai padengtos skysčiu, juostelės per visą testo atlikimo laiką turi neįdėti.

4. Sustiprintos nitroceliuliozės testavimo juostelės visiškai sudrėksta per vieną minutę ir gali būti inkubuojamos paguldytos ant nugarėlės, ant priekio arba ant gono.
5. Pipete **lašinkite po 15 µl paciento serumo (plazmos) ar 100 µl ribinio veršio / teigiamos / neigiamos kontrolės**, geriausia ties virgutinio, pagaminto juostelės galu. Paciento serumas ir kontrolė **30 minučių** inkubuokite purtytuve. Laikdami pipetę ir vėliau nupildami atkreipkite dėmesį, kad kryžmai neugrąstumėte atskirų pacientų mėginių.
6. Įsiurbkite arba atsargiai įpilkite į latakėlio visą skystą supilant skystą nitroceliuliozės testavimo juostelės lieka prikibusios prie latakėlio dugno. Skysį išlikus atsargiai nulaikinkite ant sugeriamojo popieriaus.
7. Juostelių **plovimas**: kiekvieną kartą su 1,5 ml paruošto naudoti skiedimo (plovimo) buferio **3 x 5 minutes** inkubuokite ant purtytuvo. Visada nusiurbkite arba nupilkite visą plovimo buferį prieš pasibaigiant paskutiniam plovimo etapui pasigaminkite reikalingą kiekį reikio konjugato skiedinio (žr. lentelę).
8. Į latakėlio įsiurbkite arba įpilkite visą skystą (žr. 6 punktą).
9. Pipete **lašinkamus inkubavimo latakėlius** **lašinkite po 1,5 ml pasigaminto konjugato skiedinio ir 30 minučių** inkubuokite ant purtytuvo.
10. Įsiurbkite arba įpilkite į latakėlio visą skystą
11. Juostelių **plovimas**: kiekvieną kartą su 1,5 ml paruošto naudoti skiedimo (plovimo) buferio **3 x 5 minutes** inkubuokite ant purtytuvo. Visada nusiurbkite arba nupilkite visą plovimo buferį **po 1 x 1 minutę** plaukite **dist. (dejonizuotu) vandeniu**.
12. Į latakėlio įsiurbkite arba įpilkite visą skystą (žr. 6 punktą).
13. Pipete **lašinkite** **lašinkite po 1,5 ml paruošto naudoti substrato tirpalo ir 10 ± 3 minutes** ryškinkite ant purtytuvo.
14. Spalvos ryškiniui **sustabdykite** nupildami substrato tirpalu. Po to juostelės be tarpinio inkubavimo **3 x** nuplaukite su po 1,5 ml **dist. (dejonizuoto) vandens**.
15. Nupilkite dist. (dejonizuotą) vandenį išdžiovinkite juostelės ant gvaraus, gerai sugeriančio popieriaus. Foninė spalva, kuri gali matytis ant drėgnų nitroceliuliozės testavimo juostelių juostelėms išdžiūvus visiškai pradingsta. Sustiprintos nitroceliuliozės testavimo juostelės džiūsta tiek ilgiau nei **pastatinas** nitroceliuliozės testavimo juostelės.
16. Vertinimui naudokite pridėtą vertinimo protokolą. Sugrąžus labai specifines spektro juostas protokolo lape Jums bus daug lengviau **atpažinti** pacientų mėginius.

Testavimo schema žr. paskutiniame puslapyje

8.4 Imunobloto procesorių naudojimas

Automatizuotam blotui ir LINE apdorojimui validuoti tokie prietaisai: Apollo ir Profiblot. Principiniai tinkami naudoti yra visi pastatiniai blotų automatai.

9. Testo vertinimas

Patikimam vertinimui kiekvienai LINE juostelei numatytos dvi kontrolės:

1. Serumo kontrolė (= angl. serum control):

Tik inkubavus su paciento serumu po genklinimo linija (= angl. markline) pasirodo serumo inkubacijos spektro juosta.

2. Konjugato kontrolė (= angl. conjugate control):

LINE juostelėje yra kontrolinė konjugato spektro juosta, kuri pasirodo po inkubavimo su atitinkamu konjugatu.

Testo atlikimas yra galiojantis, jeigu išryškintoje nitroceliuliozės testavimo juostelėje aiškiai matosi ir serumo kontrolė, ir vidinė konjugato kontrolė.

Kontrolinio serumo ir konjugato spektro juostų padėtis nurodyta protokolo lape.

9.1 Paciento mėginio vertinimas

Reaktyviojo spektro juostų padėtis ir genklinimas nurodytas protokolo lape.

IgG ir IgA spektro juostos: FHA, CatACT, PT

9.2 Ribinės vertės kontrolės naudojimas

Ribinės vertės kontrolės PT spektro juostos intensyvumas naudojamas pusiau kiekybiniam visų pasirodančių spektro juostų vertinimui:

Pasirodančių spektro juostų	Spektro juostų intensyvumo vertinimas
-----------------------------	--

> ribinās vertās spektro juostn (PT)	teigiamas (+)
= ribinās vertās spektro juostai (PT)	ribinis (+/-)
< ribinās vertās spektro juostn (PT)	neigiamas (-)

9.3 Antigenreikgmā

Naudot ū igvālyt ū (natl ralus PT ir FHA) ir rekombinuot ū (CatACT) *Bordetella pertussis* antigen ū, gaut ū iġt ohama I fazās ġtamo, apraġas.

Antigenas / pavadinimas	Antigenreikgmā	Antikl n ū specifigkumas LINE
PT 28kDa	Kokliuġo toksinas (PT) yra eksotoksinas, sudaromas tik <i>B. pertussis</i> ir todāl jis yra labai specifinis ġiam ligos sukālājui. Jdžūdaru fermentiġkai aktyvus A subvienetas (Subunit S1) ir receptorius suriġantis B subvienetas. Aceliulinās vakcinos dalis ir antikl nai prieg PT skiep ū serumuose rodo glaudġiausi ū s ūyġdžū apsauga nuo <i>B. pertussis</i> infekcijos. Bordetella diagnostikai IgG tyrimu iġ atskiro serumo PT yra didġiausio jautrumo ir specifigkumo po > 98 % antigenas. Todāl kokliuġo toksinas gali b ū ti vadinamas <i>B. pertussis</i> infekcijos ġymens baltymu. IgA ir IgM tyrime antikl n ū atsakas DžT yra tik maġdaug 40i 50 % kokliuġo atvej ū (4, 5).	Labai specifinis <i>B. pertussis</i>
CatACT 43kDa	Adenilato ciklazās toksinas (ACT) yra antigenas, kurio neb ū na <i>B. pertussis</i> vakcinose. Jis yra esminis <i>B. pertussis</i> virulentigkumo faktorius (6). Kryġminis viso ACT baltymo reaktyvumas su RTX toksin ū ġeimos nariais i Bžaitant <i>E. coli</i> hemolizin ū (7, 8, 9,10), i kuriuose ta ġiau nāra fermentinio adenilato ciklazās vieneto, yra visuotinai ġinomas. Dāl ġios priegasties B. pertussis + CatACT LINE ūnaudojama tik N-terminalinDž00 AR ilgio ACT antigeno dalDžadinam ū CatACT), kuriame yra katalitinis domenas, specifinis <i>Bordetella sp.</i> . CatACT yra geriausias IgG tyrimo infekcijos ġymuo serologinei diagnostikai, kuriam nedaro poveikio skiep ū statusas. Diagnozās momentu 68,0 % kultlrai teigiam ū pacient ū IgG tyrime buvo seroteigiami CatACT atġvilgiu. Pasirodā, kad CatACT po PT yra antras pagal jautrum ū ġymuo (11). Todāl vienu metu Dždġius antikl n ū prieg CatACT ir PT buvim ū galima teigti apie tikātini ū mi ū arba neseniai persirgt ū infekcij ū.	Specifinis <i>Bordetella sp.</i>
FHA 220kDa	Filamentinis hemagliutininas (FHA) yra pavirġinis <i>Bordetella pertussis</i> baltymas. Jis ligos sukālājui yra svarbus adhezinas (4). Antikl n ū atsakas DžHA, ypa ġ maġdaug 80i 90 % IgG tyrime, yra labai didelis; IgA ir IgM tyrime jis yra maġdaug 50i 60 % (4, 5). Pastaruoju metu Džir ū s nepriklausomi tyrimai (3, 12, 13) parodā, kad egzistuoja kryġminis <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> ir kit ū bakterini ū lig ū sukālāj ū FHA reaktyvumas.	Maġiau specifinis

9.4 Vertinimo kriterijai

Interpretuojant serologinius rezultatus visada reikia atsiġvelgti ir Džendr ū klinikinDžaid ū, epidemiologinius duomenis ir kit ū turim ū laboratorini ū tyrim ū rezultatus.

Rekomenduojamas IgG ir IgA Džrtinimas

PT	CatACT	Reikgmā	Interpretavimas <i>B. pertussis</i>
-	- +/- +	<i>Bordetella pertussis</i> infekcijos poġymi ū nāra. Galima nuoroda Dž. <i>parapertussis</i> infekcij ū (ġr. toliau).	neigiamas

+/-	- +/- +	Yra labai ankstyvos arba jau prieš ilgą laiką buvusios <i>B. pertussis</i> infekcijos galimybė. Rekomenduojama patikrinti su antru serumu.	ribinis
+	-	Nuoroda dėti į B. pertussis infekciją. Patikrinkite skiepavimo istoriją.	teigiamas
+	+/- +	Aški nuoroda dėti į B. pertussis infekciją.	

Papildoma nuoroda **DZ** *parapertussis* infekcijai IgG ir IgA tyrime:

PT	CatACT	FHA	Reikšmė	Interpretavimas <i>B. pertussis</i>
-	+/- +	+	galima nuoroda DZ <i>B. parapertussis</i> infekcijai	neigiamas

Teigiamas atsakas DZ CatACT ir FHA be atsako DZ gali būti interpretuojamas kaip nuoroda **DZ** *parapertussis* infekcijai.

B. parapertussis infekcijos DZ patvirtinimui mes rekomenduojame po 7 dienų patikrinti antrą serumą, jeigu atveju turi ir toliau nebūti DZ. DZ jokių antikvių prieš PT. Vietoj to galima atlikti *B. parapertussis* PGR.

FHA spektro juosta: Vien tik antikvių prieš nespecifinių grupės antigenų FHA buvimas dar neleidžia daryti išvados, ar tai yra *Bordetella pertussis*, ar *Bordetella parapertussis* infekcija. Tai galėtų būti ir kryžminė FHA reakcija su *Haemophilus influenzae* arba kitais ligos sukėlėjais, arba persistuojantys antikvių (dėl skiepų susidarę antikvių) arba senesnės infekcijos antikvių (nai).

Nagrinėjant serologinius *Bordetella* rezultatus, kuriuose atsižvelgiama DZ FHA, galima vertinti ir LINE FHA spektro juostą, ypač *B. parapertussis*. Tam FHA spektro juosta vertinama pagal ribinę vertę kontrolės PT spektro juostos intensyvumui.

> ribinė vertė: teigiamas / = ribinė vertė: ribinis / < ribinė vertė: neigiamas

Nuoroda: IgA ir IgM antikvių nėra sudaromi ne visada ir todėl jie yra ne toks patikimas *Bordetella pertussis* infekcijos gyvūno IgG antikvių (nai).

9.5 Testo ribos

1. Neigiamas bloto rezultatas negali visiškai paneigti *Bordetella pertussis* infekcijos galimybės. Mėginys gali būti buvęs paimitas prieš susidarant antikvių nams arba antikvių naminas yra daugiau testo jautrumo ribos.
2. Iš nuolatinio antikvių naminas vimo arba nebuvimo negalima daryti išvadų apie gydymo sėkmę arba nesėkmę.
3. Įvairūs nepriklausomi tyrimai parodė, kad egzistuoja kryžminis *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* ir kitų bakterinių ligų sukėlėjų FHA reaktyvumas (3, 12, 13, 21).
4. Retais atvejais pacientų serumai gali rodyti atvirkštinio spektro juostas (tamsus fonas, baltos juostos); įvertinti negalima, t. y., tokiu atveju imunobloto rezultatai netikimi. Serumai reikėtų dar kartą patikrinti kitokiais serologiniais metodais.

10. Literatūra

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. Testavimo schema

Testo atlikimas trumpai:

MāginiŲ inkubavimas	30 minuŲ iŲ	15 µl paciento serumo (plazmos) / 100 µl kontrolās, kiekvienas 1,5 ml skiedimo (plovimo) buferyje
Plovimas	3 x 5 minutes	KiekvienŲ kartŲ su 1,5 ml skiedimo (plovimo) buferio
Konjugato inkubavimas	30 minuŲ iŲ	Su 1,5 ml paruoŲti naudoti skiedinio (1 + 100)
Plovimas	3 x 5 minutes 1 x 1 minutŲ	KiekvienŲ kartŲ su 1,5 ml skiedimo (plovimo) buferio Su dist. (dejonizuotu) vandeniu
Substrato inkubavimas	10 ± 3 minuŲ iŲ	KiekvienŲ su 1,5 ml substrato tirpalo
Fiksavimas	3 x be tarpinio inkubavimo	KiekvienŲ kartŲ su 1,5 ml dist. (dejonizuoto) vandens

Konjugato skiedimo lentelā: (suapvalinta)

JuosteliŲ skaiŲ ius	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Skiedimo (plovimo) buferis	1,5 ml	3,0 ml	4,5 ml	6,0 ml	7,5 ml	9,0 ml	11,0 ml	12,0 ml	14,0 ml	15,0 ml
Konjugato koncentratas	15 µl	30 µl	45 µl	60 µl	75 µl	90 µl	110 µl	120 µl	140 µl	150 µl
Galutinis tŲ ris	1,515 ml	3,03 ml	4,545 ml	6,06 ml	7,575 ml	9,09 ml	11,11 ml	12,12 ml	14,14 ml	15,15 ml

JuosteliŲ skaiŲ ius	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Skiedimo (plovimo) buferis	17,0 ml	18,0 ml	20,0 ml	21,0 ml	23,0 ml	24,0 ml	26,0 ml	27,0 ml	29,0 ml	30,0 ml
Konjugato koncentratas	170 µl	180 µl	200 µl	210 µl	230 µl	240 µl	260 µl	270 µl	290 µl	300 µl
Galutinis tŲ ris	17,17 ml	18,18 ml	20,2 ml	21,21 ml	23,23 ml	24,24 ml	26,26 ml	27,27 ml	29,29 ml	30,3 ml

JuosteliŲ skaiŲ ius	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Skiedimo (plovimo) buferis	32,0 ml	33,0 ml	35,0 ml	36,0 ml	38,0 ml	39,0 ml	41,0 ml	42,0 ml	44,0 ml	45,0 ml
Konjugato koncentratas	320 µl	330 µl	350 µl	360 µl	380 µl	390 µl	410 µl	420 µl	440 µl	450 µl
Galutinis tŲ ris	32,32 ml	33,33 ml	35,35 ml	36,36 ml	38,38 ml	39,39 ml	41,41 ml	42,42 ml	44,44 ml	45,45 ml

JuosteliŲ skaiŲ ius	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Skiedimo (plovimo) buferis	47,0 ml	48,0 ml	50,0 ml	51,0 ml	53,0 ml	54,0 ml	56,0 ml	57,0 ml	59,0 ml	60,0 ml
Konjugato koncentratas	470 µl	480 µl	500 µl	510 µl	530 µl	540 µl	560 µl	570 µl	590 µl	600 µl
Galutinis tŲ ris	47,47 ml	48,48 ml	50,5 ml	51,51 ml	53,53 ml	54,54 ml	56,56 ml	57,57 ml	59,59 ml	60,6 ml