

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgG LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-32)

Rendelési szám: WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

Rendelési szám: WE116G96

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgA LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-32)

Rendelési szám: WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

Rendelési szám: WE116A96

CSAK IN VITRO DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

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 HU

Tartalom

1. Alkalmazás célja	3
2. A teszt működési elve	3
3. A csomag tartalma.....	3
3.1 Készlet 32 meghatározáshoz.....	3
3.2 Készlet 96 meghatározáshoz.....	3
4. A tesztkit és a reagensek tárolása és eltarthatósága.....	4
5. Óvintézkedések és biztonsági előírások	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza).....	4
7. Vizsgálati anyag.....	5
8. A vizsgálat elvégzése	5
8.1 Vizsgálati anyag	5
8.2 A reagensek előkészítése	5
8.3 Az immunoblot vizsgálat elvégzése.....	5
8.4 Immunoblot-processzorok alkalmazása	6
9. A vizsgálati eredmények kiértékelése.....	6
9.1 A betegminták kiértékelése.....	6
9.2 A határérték (cut-off) kontrollok alkalmazása	6
9.3 Az antigének jelentése	7
9.4 Kiértékelési szempontok	7
9.5 A teszt határai	8
10. Irodalom	9
11. A teszt folyamatának vázlata.....	10

1. Alkalmazás célja

Immunoblot csík tesztkészlet Bordetella pertussis-specifikus IgG- ill. IgA antitestek mennyiségi meghatározására humán szérumból. A készlet a friss, a közelmúltban vagy hosszabb idővel a vizsgálat előtt lezajlott Bordetella pertussis fertőzés felismerésére, valamint a nem jellegzetes köhögéssel járó hosszabb ideje fennálló klinikai manifesztációk differenciáldiagnózisára szolgál. A Pertussis-Toxin (PT) és az adenilát-cikláz toxin katalitikus részének (CatACT) egyidejű kimutatása a legtöbb esetben megkönnyítheti a Bordetella pertussis-fertőzés és az oltás megkülönböztetését.

Továbbá az immunoblot vonal utalhat esetleges B. parapertussis fertőzés jelenlétére. Specifikus PT-elleni antitestek hiánya CatACT [genus-specifikus] (17) és FHA elleni antitestek egyidejű fellépése mellett értékelhető B. parapertussis fertőzésre utaló jelként.

2. A teszt működési elve

A *B. pertussis* fehérjéit egy speciális porlasztási eljárás segítségével nitrocellulóz membránra viszik fel. A nitrocellulóz membránt ezután csíkokra vágják.

Az antigénhordozó nitrocellulóz csíkok humán szérum- vagy plazmamintákkal való inkubációja lehetővé teszi a jelenlévő specifikus antitestek kimutatását. Ezek az antitestek immunkomplexeket képeznek a tesztcsíkokra rögzített antigénnel. A meg nem kötött antitesteket mosási lépések során eltávolítják, majd a nitrocellulóz-csíkokat alkalikus foszfáttal konjugált anti-humán IgG illetve IgA antitestekkel inkubálják. Miután a meg nem kötött konjugált antitesteket egy további mosási lépéssel eltávolítják, az antigén-antitest komplexek (a megkötött antitestek) láthatóvá tétele következik egy szintelen szubsztrát hozzáadásával, mely enzimatiszál átalakítás után ibolyakék színű csíkokat (antigén sávokat) eredményez. Az enzim-szubsztrát reakciót a nitrocellulóz-csíkok desztillált vagy ioncserélt vízben történő mosásával állítják le. A megjelenő csíkok mintázata alapján következtethetünk specifikus IgG illetve IgA antitestek jelenlétére.

3. A csomag tartalma

3.1 Készlet 32 meghatározáshoz

1. IgG ill. IgA Nitrocellulóz csíkok porlasztással felvitt antigénnel, fóliával megerősítve, füzetekbe kötve, felhasználásra kész	1x	32 csík
2. IgG ill. IgA határérték (cut-off) kontroll, humán szérum , előhígított	1x	1,0 ml
3. Hígító- /mosópuffer , pH 7,3 (10x konc.), Tris pufferben, tartósítószerrel	2x	50 ml
4. IgG- ill. IgA-konjugátum (100x konc.) Anti-humán, (kecske) alkalikus foszfátáz, tartósítószerrel	1x	0,7 ml
5. Szubsztrát (BCIP/NBT), felhasználásra kész	1x	57 ml
6. Kiértékelési protokoll az eredmények jegyzékonyvezéséhez és archiválásához	1x	1 db

3.2 Készlet 96 meghatározáshoz

7. IgG ill. IgA Nitrocellulóz csíkok porlasztással felvitt antigénnel, fóliával megerősítve, füzetekbe kötve, felhasználásra kész	3x	32 csík
9. IgG ill. IgA határérték (cut-off) kontroll, humán szérum , előhígított	2x	1,0 ml
10. Hígító- /mosópuffer , pH 7,3 (10x konc.), Tris pufferben, tartósítószerrel	4x	50 ml
11. IgG- ill. IgA-konjugátum (100x konc.) Anti-humán, (kecske) alkalikus foszfátáz, tartósítószerrel	3x	0,7 ml
12. Szubsztrát (BCIP/NBT), felhasználásra kész	3x	57 ml
13. Kiértékelési protokoll az eredmények jegyzékonyvezéséhez és archiválásához	3x	1 db

Kérésre külön kapható:

IgG ill. IgA- Pozitív kontroll, humán szérum, előhígított, 0,5 ml.

A pozitív sávok > határérték (cut-off) sávok a mellékelt tanúsítványban találhatóak

(Rendelési szám: IgG: WE116P60 ill. IgA: WE116P40)

IgG/IgA- Negatív kontroll, humán szérum, előhígított, 0,5 ml.

A negatív kontrollon nem láthatóak sávok, ill. nem láthatóak a releváns sávok és > határérték (cut-off) sávok kiértékeléséhez szükséges sávok.

4. A tesztkit és a reagensek tárolása és eltarthatósága

A tesztkitet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzési tanúsítványt.

1. Az egyes reagenseket nem szabad lefagyasztani illetve magas hőmérsékletnek kitenni.
2. A reagenseket a lejáratí időn túl nem szabad felhasználni.
3. Kerülje a reagensek erős fényben történő tárolását.
4. A BCIP / NBT szubsztrátoldat fényérzékeny, ezért sötétben kell tárolni.
5. **Nitrocellulóz tesztcsíkok:** A tasakból kivett tesztcsíkokat azonnal fel kell használni. A fel nem használt csíkokat tartalmazó tasakot azonnal vissza kell zárni és 2-8°C között kell tárolni. Az eredmények archiválásához (a csíkok kifakulásának megakadályozására) a nitrocellulóz tesztcsíkokat feltétlenül védeni kell a közvetlen napfénytől.

Anyag	Állapot	Tárolás	Stabilitás
Vizsgálati minták	hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Tesztcsíkok	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban)	3 hónap
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	hígított	+2 és +8°C között	kb. 6 óra
Szubsztrátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
	végghígított (használatra kész)	+2 és +8°C között	4 hét
	végghígított (használatra kész)	vagy szobahőmérséklet	2 hét

5. Óvintézkedések és biztonsági előírások

14. Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és nitrocellulóz tesztcsík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő és ennek megfelelő óvatossággal kezelendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
15. Az immunoblot kivitelezése során viseljen eldobható kesztyűt és használjon műanyag csipeszt.
16. A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.
17. Az inkubációs kádakat a gyártó csak egyszeri használatra fejlesztette ki. Az inkubációs kádak többszöri használata a felhasználó felelőssége. Ha a többszöri használat mellett dönt, javasoljuk, hogy az inkubációs kádakat használat után fertőtlenítsen több órán keresztül 1% nátrium-hipoklorit oldatban, mosogassa el és alaposan öblítse el csapvízzel majd desztillált vagy ioncserélt vízzel.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

1. Inkubációs kanna (igény esetén megrendelhető a WE300 rendelési számon)
2. Rázógép (vertikális, nem körkörös)
3. Spriccflaska a reakció leállításához
4. Pipetta vagy kézi mosó készülék
5. Mikropipetták: 5 µl és 1500 µl
6. Pipettahegyek
7. Mintaedények (csövek) 2-20 ml térfogattal
8. Műanyag csipesz
9. Desztillált vagy ioncserélt víz
10. Filterpapír

7. Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

8. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által elírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

8.1 Vizsgálati anyag

18. Páciensmintánként 15 µl szérum vagy plazma szükséges.
19. A vérmintákat aseptikusan, a véna megszívásával kell levenni. Teljes alvadás után le kell választani a szérumot (plazmánál kiesik). Hosszabb tároláshoz a szérumokat -20°C -ra le kell fagyasztani.
20. A többszöri felolvasztást kerülni kell.
21. Hőinaktivált, hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőzött mintákat nem szabad felhasználni, mivel hamis eredményekhez vezethetnek.
22. Zavaros szérummintákat (különösen felolvasztás után) nem szabad felhasználni. Centrifugálás (5 perc, 1000 g) után a tiszta felülúszót lepipetázva, azt használja fel a testben.

8.2 A reagensek előkészítése

23. A laboratóriumi rutinmunkát segítő az összes LINE egyetlen testfutamban, azonos inkubációs idővel, különböző paraméter és különböző gyártási tételbe tartozó komponensekkel feldolgozható. Az alkalmazandó határérték (cut-off) kontrollok paraméter- és sarzsspecifikusak.
24. Hígítás előtt engedjen minden reagenst felmelegedni szobahőmérsékletre. Csak a legjobb minőségű, szobahőmérsékletű desztillált vagy ioncserélt vizet használjon.
25. A kihígított munkaoldatokat alkalmazás előtt alaposan keverje fel.
26. **Hígító- /mosópuffer**
A hígító- /mosóoldat 10-szörös töménységben kerül kiszerezésre. A hígító- /mosóoldatot 01:10:00 arányban hígítsa desztillált vagy ioncserélt vízzel (10ml/50ml/100ml koncentrátum + 90ml/450ml/900ml deszt./ioncserélt víz) és alaposan keverje meg.
A hígító-/mosófolyadék, mind tömény, mind hígított állapotban sárga elszíneződést mutathat. Ez a sárga elszíneződés sem a hígító-/mosófolyadék eltarthatóságát, sem a teszt eljárás működését és diagnosztikai megbízhatóságát nem befolyásolja.
27. **IgG- ill. IgA-konjugátum:**
A konjugátumot hígítsa fel 1:100 arányban (megfelelően kihígított) hígító- /mosópufferben és jól keverje meg. Szérum mintánként 1,5 ml konjugátum munkaoldat szükséges. Ld. konjugációs hígítási táblázat (12. pont: A teszt folyamatának vázlata).
28. **Szubsztrátoldat**
A szubsztrátoldatot felhasználásra kész állapotban csomagoljuk és szállítjuk.

8.3 Az immunoblot vizsgálat elvégzése

Vigyázat: A B. Pertussis + CatACT LINE teszt korrekt végrehajtása és kiértékelése érdekében minden teszt során egy paraméter- és sarzsspecifikus határérték (cut-off) kontroll tesztet is el kell végezni.

A *Bordetella pertussis* biztonságos diagnosztizálásához az LINE tesztet az IgG és IgA osztályban is ajánlott elvégezni.

29. A tesztet szobahőmérsékleten kell végezni.
30. Minden mintához helyezzen egy csíkot egy tiszta inkubációs kád barázdájába. A csíkokat lehetőség szerint csak a megjelölt felső végükön érintse.
31. Pipetázzon 1,5 ml felhasználásra kész **hígító- /mosópuffer** minden tesztcsíkra és helyezze az inkubációs kannát a rázógépre. Ügyeljen rá, hogy a folyadék egyenletesen fedje be a nitrocellulóz tesztcsíkokat; a csíkoknak a teszt során végig nem szabad kiszáradniuk.

32. A megerősített nitrocellulóz csíkok egy perc alatt teljesen átnedvesednek és tetszés szerint inkubálhatóak a hátukra, oldalukra vagy elülső felükre fektetve.
33. Egyenként **15 µl páciensszérumot-plazmát**, illetve **100 µl határérték / pozitív / negatív kontrollt** kell hozzápipettázni, lehetőleg a csík felső megjelölt végére. Inkubálja **30 percig** a betegszérumot és kontrollokat a rázógépben. Pipetázás és a folyadékok leöntése során ügyeljen arra, hogy az egyes betegmintáknál ne fordulhasson elő keresztkontamináció.
34. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy óvatosan öntse le. A folyadék leöntésekor a nitrocellulóz csíkok a barázdák aljához tapadva maradnak. A maradék folyadékot csepegtesse ki egy papírtörölközőre.
35. A csíkok **mosása**: inkubálja a csíkokat a rázógépben, csíkonként 1,5ml felhasználásra kész hígító- /mosópufferben, **3 x 5 percig**. A mosópuffert mindig szívja le vagy öntse le teljes egészében. Az utolsó mosási lépés befejezése előtt készítsen el (hígítsa ki) a szükséges mennyiségű konjugátum munkaidőadatát (ld. táblázat).
36. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy óvatosan öntse le (ld. 6. pont).
37. Csíkonként pipetázzon 1,5 ml-t az előzők szerint elkészített **konjugátum munkaidőadatból** a megfelelő inkubációs barázdákba és inkubálja a csíkokat **30 percig** a rázógépben.
38. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy öntse le.
39. A csíkok **mosása**: inkubálja a csíkokat a rázógépben, csíkonként 1,5ml felhasználásra kész hígító- /mosópufferben **3 x 5 percig**. A mosópuffert mindig szívja le vagy öntse le teljes egészében. Végül öblítse le a csíkokat **1 x 1 percig** desztillált vagy ioncserélt vízben.
40. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy óvatosan öntse le (ld. 6. pont).
41. Csíkonként pipetázzon 1,5 ml-t **szubsztrátoldatból** a barázdákba és hívja elő a csíkokat **10 ± 3 percig** a rázógépben.
42. Az előhívást (a szín megjelenését) a szubsztrátoldat leöntésével **állítsa le**. Végül mossa le a csíkokat **3 x 1,5 ml desztillált vagy ioncserélt vízzel** (inkubáció nélkül).
43. Öntse le a desztillált vagy ioncserélt vizet és szárítsa meg a csíkokat egy tiszta papírtörölközőn. A nedves nitrocellulóz tesztcsíkokon megfigyelhető háttér-elszíneződés a csíkok megszáritásával teljesen eltűnik. A megerősített nitrocellulóz tesztcsíkok a közönséges nitrocellulóz tesztcsíkokhoz viszonyítva valamivel hosszabb időt igényelnek a száradáshoz.
44. A kiértékeléshez használja a mellékelt kiértékelési protokollt. A specifikus sávok feliratozása a protokoll-lapon és közvetlenül a nitrocellulóz filteren megkönnyíti a betegminták kiértékelését.

A teszt folyamatának vázlatát ld. az utolsó oldalon

8.4 Immunoblot-processzorok alkalmazása

A blotok és LINE-ok automatikus feldolgozására az alábbi eszközök vannak jóváhagyva: Apollo és Profiblot. Alapjában véve minden kereskedelembe kapható blotautomata alkalmas.

9. A vizsgálati eredmények kiértékelése

A biztos kiértékeléshez minden LINE csík két kontrollal van ellátva:

1. Szérum kontroll (= serum control):

Csak a betegszérummal való inkubáció után jelenik meg a jelölési vonal (=markline) alatt a széruminkubációs sáv.

2. Konjugációs kontroll (= conjugate control):

Az LINE csíkon egy konjugációs kontroll sáv található, mely a megfelelő konjugátummal való inkubálás hatására jelenik meg.

A végrehajtott teszt akkor érvényes, ha az előhívott nitrocellulóz tesztcsíkon mind a szérumkontroll, mind a belső konjugációs kontroll sáv egyértelműen látható.

A szérum- és konjugációs sávok pozícióját a protokoll-lapon találja.

9.1 A betegminták kiértékelése

A reagáló sávok pozícióját és leírását a jegyzőkönyv lapon találja.

IgG és IgA-sávok: FHA, CatACT, PT

9.2 A határérték (cut-off) kontrollok alkalmazása

A határérték (cut-off) kontrollok PT sávjának intenzitása segíti a kialakuló sávok szemikvantitatív kiértékelését:

Fellépő sávok	A sávintenzitások értékelése
> Határérték (cut-off) sáv (PT)	pozitív (*)
= Határérték (cut-off) sáv (PT)	határérték (+/-)
< Határérték (cut-off) sáv (PT)	negatív (-)

9.3 Az antigének jelentése

A használt, tisztított (natív PT és FHA) és rekombináns (CatACT) *Bordetella pertussis* antigének felsorolása, amelyek a Tohama I. fázis törzsből származnak.

Antigén / leírás	Az antigének jelentése	Az antitestek specifitása a LINE testben
PT 28kDa	A Pertussis-Toxin (PT) exotoxin, amely csak <i>B. pertussis</i> esetén fordul elő és ezért rendkívül specifikus erre a kórokozóra. Enzimatikusan aktív A-alegységből (Subunit S1) és receptorhoz kötődő B-alegységből áll. Az acelluláris oltóanyag alkotórésze és az oltószerumban lévő PT-elleni antitestek mutatják a legnagyobb korrelációt a <i>B. pertussis</i> -fertőzés elleni védekezéssel. Az IgG-ben egyedi szérum útján megvalósított Bordetella-diagnosztika esetén a PT a legmagasabb érzékenységet és specifitást (mindekettőt >98%) adó antigén. Ezért a Pertussis-Toxin kijelölhető a <i>B. pertussis</i> fertőzés jelzőfényeként. IgA-ban és IgM-ben a PT-elleni antitestreakció csak a Pertussis-esetek kb. 40-50%-ában van jelen (4, 5).	Magas specifitású <i>B. pertussis</i> -ra
CatACT 43kDa	Az adenilát-cikláz toxin (ACT) olyan antigén, amely nem fordul elő a <i>B. pertussis</i> oltóanyagokban. Ez a <i>B. pertussis</i> (6) meghatározó virulenciafaktora. Jól ismert a teljes ACT-fehérjék keresztreaktivitása az RTX-toxincsalád tagjaival - beleértve az E.coli hemolizint (7, 8, 9,10) is - amelyeknél azonban az adenilát-cikláz enzimátikus egysége hiányzik. Ezen az alapon a <i>B. pertussis</i> + CatACT VONAL a (CatACT-ként is jelölt) ACT-antigénnek csak az N-terminális, 400 AS hosszúságú, a <i>Bordetella sp.</i> -re specifikus katalitikus doméneket tartalmazó részét használja. A CatACT a legjobb fertőzési marker az IgG szerodiagnosztikában, melyet az oltási állapot nem befolyásol. A diagnózis idején a kultúra-positív betegek 68,0%-a volt CatACT szeropositív. Kimutatták, hogy a CatACT a PT után a második legérzékenyebb marker. (11) A CatACT és a PT elleni antitestek egyidejű kimutatása ezért akut vagy a közelmúltban lezajlott fertőzésre utal.	<i>Bordetella</i> specifikus
FHA 220kDa	A Filamentózus hemagglutinin (FHA) a <i>Bordetella pertussis</i> egyik felszíni fehérjeje. Az FHA a kórokozó számára fontos adhezin (4). Az FHA-ra adott antitestválasz különösen az IgG diagnosztikában igen magas (80-90%), míg az IgA és IgM diagnosztikában 50-60% között mozog (4, 5). Időközben több, független vizsgálat (3, 12, 13) kimutatta, hogy a <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> és más bakteriális kórokozók FHA fehérjeje között keresztreakció léphet fel.	Kevésbé specifikus

9.4 Kiértékelési szempontok

A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.

PT	CatACT	Jelentés	Interpretáció <i>B. pertussis</i> -ra
-	- +/- +	Az eredmény nem utal <i>Bordetella pertussis</i> fertőzésre. A <i>B. parapertussis</i> fertőzésre utaló esetleges jelek (lásd alább)	negatív
+/-	- +/- +	Fennállhat egy nagyon korai vagy nagyon régen lezajlott <i>B. pertussis</i> fertőzés lehetősége. Javasolt egy második szérummal végzett ellenőrzővizsgálat.	határérték
+	-	Friss vagy a közelmúltban lezajlott <i>Bordetella pertussis</i> fertőzésre utaló eredmény. Oltási állapot ellenőrzendő	pozitív
+	+/- +	Egyértelműen friss vagy a közelmúltban lezajlott <i>Bordetella pertussis</i> fertőzésre utaló eredmény.	

További *B. parapertussis* fertőzésre utaló jelek az IgG-ben és IgA-ban:

PT	CatACT	FHA	Jelentés	Interpretáció <i>B. pertussis</i> -ra
-	+/- +	+	esetleges utalás <i>B. parapertussis</i> fertőzésre	negatív

CatACT és FHA pozitív eredmény hiányzó PT-válasz esetén esetleges *B. parapertussis* fertőzés fennállásaként értelmezendő

A *B. parapertussis* fertőzés gyanújának megerősítése céljából javasoljuk második szérum vizsgálatát 7 nappal később; abban sem lehetnek PT-elleni antitestek kimutathatóak. Alternatív megoldásként elvégezhető PCR *B. parapertussis*-ra.

FHA-sávok: Ha csak egyedül a nem specifikus, csoportosított FHA elleni antitestek vannak jelen, az nem tesz lehetővé arra vonatkozó kijelentést, hogy *Bordetella pertussis* vagy *Bordetella parapertussis* fertőzésről van-e szó. Itt szó lehet az FHA és a *Haemophilus influenzae* vagy más kórokozó keresztreakciójáról, vagy pedig perzisztens antitestekről (oltási antitestek vagy visszamaradt fertőzésből származó antitestek). Az FHA-t figyelembe véve szerológiai *Bordetella*-eredményekre vonatkozó kérdésfeltevésnél a VONAL FHA-sávjai is kiértékelhetők, lásd: *B. parapertussis*. Itt az FHA-sáv értékelése a Cut off kontroll PT-sávját meghaladó intenzitása alapján történik:

➤ Cut off: pozitív / = Cut off: határérték / < Cut off: negatív

Tanács: IgA- és IgM-antitestek nem mindig képződnek, ezért valamivel kevésbé megbízható markerei a *Bordetella pertussis* fertőzésnek, mint az IgG-antitestek.

9.5 A teszt határai

- Negatív immunoblot eredmény nem zárja ki teljes egészében a *Bordetella pertussis* fertőzés lehetőségét. Lehetséges, hogy a mintát az antitestek megjelenése előtt vették, illetve, hogy az antitesttiter a teszt kimutatási határértéke alatt van.
- Az antitestek állandó, tartós jelenlétéből illetve hiányából nem lehet egy terápia eredményességére illetve kudarcára következtetni.
- Több független vizsgálat alapján kimutatható volt, hogy jelen van az FHA és a *Bordetella pertussis*, a *B. parapertussis*, illetve más kórokozók közötti keresztreakció (3, 12, 13, 21).
- Ritka esetekben a betegszérumok "negatív sávokat" mutathatnak (sötét háttér, fehér sávok); ezeket a tesztek nem szabad figyelembe venni, az immunoblot ezekben az esetekben nem értékelhető. A szérumot más szerológiai módszerekkel kell ellenőrizni.

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 ñ 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. 68:1735ñ1739.
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. 6:325ñ330. 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. 64:167ñ175.
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. 27:285ñ290.
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. 67:2090ñ2095.
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. Gnärpe, H. Gnärpe, 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. Bissgard, 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.

A teszt kivitelezésének rövid leírása:

Mintainkubáció	30 perc	15 µl páciensszérum/-plazma / 100 µl kontroll tesztenként 1,5 ml hígító- /mosópufferrel
Mosás	3 x 5 perc	Tesztenként 1,5 ml hígító- /mosópufferrel
Konjugátum inkubáció	30 perc	1,5 ml munkaoldattal (1:100 hígított)
Mosás	3 x 5 perc 1 x 1 perc	Tesztenként 1,5 ml hígító- /mosópufferrel Desztillált / ioncserélt vízzel
Szubsztrátinkubáció	10 ± 3 perc	Tesztenként 1,5 ml szubsztrátoldattal
Leállítás	3 x, köztes inkubáció nélkül	Tesztenként 1,5 ml desztillált / ioncserélt vízzel

Táblázat: konjugátum munkaoldat hígítása (kerekítve)

Csíkok száma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hígító- /mosópuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugátum koncentrátum	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Végső térfogat	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Csíkok száma	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Hígító- /mosópuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugátum koncentrátum	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Végső térfogat	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Csíkok száma	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Hígító- /mosópuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugátum koncentrátum	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Végső térfogat	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Csíkok száma	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Hígító- /mosópuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugátum koncentrátum	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Végső térfogat	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml