

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgG LINE Immunoblot
(B. pertussis + CatACT IgG LINE-32)

Užsakymo Nr.: WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

Užsakymo Nr.: WE116G96

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgA LINE Immunoblot
(B. pertussis + CatACT IgA LINE-32)

Užsakymo Nr.: WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

Užsakymo Nr.: WE116A96

TIK IN VITRO DIAGNOSTIKAI

Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

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



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 įspėjamosios nuorodos	4
6. Papildomai reikalingos medžiagos (neįeina į tiekimo 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 Antigenų 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* specifinių IgG ar IgA antikūnų įrodymui žmogaus serume. Rinkinys skirtas šviežiai, nesenai ar prieš ilgesnį laiką persirgtai *Bordetella pertussis* infekcijai atpažinti arba diferencinei ilgiau truncančių klinikinių manifestacijų su necharakteringu kosuliu diagnostikai. Kadangi vienu metu įrodomi specifiniai prieš kokliušo toksiną (PT) ir katalitinę adenilato ciklazės toksino (CatACT) dalį nukreipti antikūnai, dauguma atvejų galima lengviau atskirti *Bordetella pertussis* infekciją nuo skiepų.

Be to, LINE imunoblotas gali pateikti nuorodą į galimą *B. parapertussis* infekciją. Specifinių prieš PT nukreiptų antikūnų nebuvimas, tuo pačiu esant antikūnams prieš CatACT [specifinio rūšiai] (17) ir FHA, gali būti vertinamas kaip nuoroda į *B. parapertussis* infekciją.

2. Testo veikimo principas

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

Inkubuojant antigenu padengtas nitroceliuliozės juosteles su žmogaus serumu (plazmos) mėginiais galima įrodyti specifinių antikūnų buvimą. Šie antikūnai sudaro imuninius kompleksus su ant testavimo juostelių fiksuotais antigenais. Plovimo etapais pašalinus nesurištus antikūnus, atskiros nitroceliuliozės juostelės su šarmine 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 nedažyto substrato, kuris jo fermentinės reakcijos metu sudaro mėlynai violetines spektro juostas („antigenų 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 užpurkštu antigenu, sustiprintos plėvele, surūšiuotos paketėliuose, paruoštos naudoti	1x	32 juostelės
2. IgG ar IgA ribinių verčių kontrolė , žmogaus serumas, praskiestas	1x	1,0 ml
3. Skiedimo (plovimo) buferis , pH 7,3 (10x konc.), su „Tris“ ir konservantu	2x	50 ml
4. IgG ar IgA konjugatas (100x konc.) prieš žmogų, (ožkos) šarminė 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 užpurkštu antigenu, sustiprintos plėvele, surūšiuotos paketėliuose, paruoštos naudoti	3x	32 juostelės
2. IgG ar IgA ribinių verčių kontrolė , žmogaus serumas, praskiestas	2x	1,0 ml
3. Skiedimo (plovimo) buferis , pH 7,3 (10x konc.), su „Tris“ ir konservantu	4x	50 ml
4. IgG ar IgA konjugatas (100x konc.) prieš žmogų, (ožkos) šarminė 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 įsigyti papildomai:

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

Teigiamos spektro juostos > ribinių verčių spektro juostas nurodytos kartu pristatomame sertifikate.

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

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

Neigiamos kontrolės nerodo jokių arba rodo netinkamas vertimui > ribines vertės spektro juostas.
(Užsak. Nr.: IgG/IgA: WE116N20)

4. Testavimo rinkinio ir reagentų laikymas ir tinkamumo laikas

Testavimo rinkinį laikyti 2–8 °C. Atskirų komponentų tinkamumo laikas nurodytas atitinkamoje etiketėje; rinkinio tinkamumo laiką žr. kokybės kontrolės sertifikate.

1. Atskirų reagentų negalima užšaldyti ir juos reikia saugoti nuo aukštos temperatūros poveikio.
2. Reagentų nenaudoti pasibaigus tinkamumo laikui.
3. Stenkitės nelaikyti reagentų skaisčioje šviesoje.
4. BCIP/ NBT substrato tirpalas yra jautrus šviesai ir jį reikia laikyti tamsioje.
5. **Nitroceliuliozės testavimo juostelės:** Išėmę iš maišelio juosteles tuojau pat naudokite. Maišelį su nereikalingomis juostelėmis vėl tvirtai uždarykite ir laikykite 2–8 °C temperatūroje. Rezultatų archyvavimui nitroceliuliozės testavimo juosteles, kad spektro juostos neišbluktų, būtinai reikia saugoti nuo tiesioginių saulės spindulių.

Medžiaga	Būsena	Laikymas	Tinkamumo laikas
Tiriamieji mėginiai	neskiesti	+2 iki +8 °C	1 savaitė
Testavimo juostelės	atidarius	+2 iki +8 °C (laikyti kartu tiekiamame maišelyje)	3 mėnesiai
Kontrolės	atidarius	+2 iki +8 °C	3 mėnesiai
Konjugatas	atidarius	+2 iki +8 °C	3 mėnesiai
	praskiestas	+2 iki +8 °C	apie 6 h
Substratas	atidarius	+2 iki +8 °C (tamsioje vietoje)	3 mėnesiai
Ploviklis	atidarius	+2 iki +8 °C (tamsioje vietoje)	3 mėnesiai
	galutinai praskiestas (paruoštas naudojimui)	+2 iki +8 °C	4 savaitės
	galutinai praskiestas (paruoštas naudojimui)	arba patalpų temperatūroje	2 savaitės

5. Atsargumo priemonės ir įspėjamosios nuorodos

7. Kaip kontroliniai serumai naudojami tik serumai, kurie buvo patikrinti ir diagnozuoti kaip neigiami HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK ir hepatito B paviršinio antigeno požiūriu. Nepaisant to, kontrolinius serumus, mėginius, atskiestus mėginius, konjugatus ir nitroceliuliozės juosteles reikia laikyti potencialiai infekcinėmis medžiagomis ir elgtis su jomis atitinkamai atsargiai. Galioja atitinkamos laboratorijos darbo taisyklės.
8. Atliekant imunobloto tyrimą reikia mūvėti vienkartinėmis pirštinėmis ir naudoti plastikinį pincetą.
9. Naudotos medžiagos utilizuojamos pagal šalyje galiojančias direktyvas.
10. Inkubavimo vonėles gamintojas numatė tik vienkartiniam naudojimui. Jeigu jos naudojamos pakartotinai, tai yra vien tik naudotojo atsakomybė. Jeigu jos būtų naudojamos keletą kartų, mes rekomenduojame inkubavimo vonėles po naudojimo keletą valandų dezinfekuoti 1 % natrio hipochlorido tirpale, išvalyti ir kruopščiai nuplauti vandentiekio vandeniu bei nuskalauti dist. (dejonizuotu) vandeniu.

6. Papildomai reikalingos medžiagos (neįeina į tiekimo komplektaciją)

1. Inkubavimo vonelė (prireikus galima įsigyti užsak. Nr. WE300.08)
2. Purtytuvas (vertikalus, ne centrifuginis)
3. Plovyklė sustabdymui
4. Pipetė arba rankinis plautuvas
5. 5 µl–1500 µl mikropipetės
6. Pipečių atgaliai
7. 2–20 ml tūrio mėgintuvėliai (vamzdiniai)

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

7. Tiriamoji medžiaga

Kaip tiriamoji medžiaga gali būti naudojamas serumas ir plazma (čia 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

11. Vieno paciento mėginiui reikia 15 µl serumo arba plazmos.
12. Kraujo mėginiai turi būti paimti iš venos aseptinėmis sąlygomis. Visiškai sukrešėjus reikia atskirti serumą (nereikia plazmos atveju). Ilgesniam laikymui serumus reikia užšaldyti -20 °C temperatūroje.
13. Stenkitės nešaldyti ir neatitirpinti serumų keletą kartų.
14. Karščiu išaktyvintų, lipeminių, hemolizuotų arba mikrobiologiškai užterštų serumų rezultatai gali būti neteisingi, todėl tokių serumų reikėtų nenaudoti.
15. Nenaudokite drumstų serumo mėginių (ypač atitirpintų), prireikus juos centrifuguokite (5 min prie 1000 x g), pipete surinkite skaidrų skystį viršuje ir naudokite testavimui.

8.2 Reagentų paruošimas

16. Taikantis prie laboratorijos rutinos visus LINE testus galima sujungti į vieną testavimo ciklą su vienoda inkubavimo trukme ir įvairių parametrų ir partijų komponentais. Ribinės vertės kontrolės naudojamos specialios pagal parametrus ir partijas.
17. Prieš skieddami atitinkamus visų testavimo reagentų koncentratų sušildykite iki patalpų temperatūros. Naudokite tik aukštos kokybės ir patalpų temperatūros dist. (dejonizuotą) vandenį.
18. Prieš pradėdami testuoti skiedinius gerai išmaišykite.
19. **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 šiek tiek gelsvas. Ši gelsva spalva neturi jokios įtakos nei skiedimo (plovimo) buferio tinkamumo laikui, nei testavimo ciklo veikimui ir diagnostiniam patikimumui.
20. **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 „Testavimo schema“).
21. **Substrato tirpalas**
Substrato tirpalas pristatomas paruoštas naudoti.

8.3 Imunobloto testo atlikimas

Dėmesio! Kad „B. pertussis + CatACT LINE“ tyrimas būtų atliekamas ir įvertinamas teisingai, kiekviename testavimo cikle būtina kartu vykdyti ir parametrų ir partijai specialią ribinių verčių kontrolę.

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

22. Testas atliekamas patalpų temperatūroje.
23. Kiekvienam mėginiui į švarios inkubavimo vonelės latakėlį įdėkite po 1 juostelę. Juosteles stenkitės imti tik už pažymėto viršutinio galo.
24. Pipete įlašinkite 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 neišdžiūti.

25. Sustiprintos nitroceliuliozės testavimo juostelės visiškai sudrėksta per vieną minutę ir gali būti inkubuojamos paguldytos ant nugarėlės, ant priekio arba ant šono.
26. Pipete įlašinkite po **15 µl paciento serumo (plazmos)** ar **100 µl ribinių verčių / teigiamos / neigiamos kontrolės**, geriausia ties viršutiniu, pažymėtu juostelės galu. Pacientų serumą ir kontrolę **30 minučių** inkubuokite purtytuve. Lašindami pipete ir vėliau nupildami atkreipkite dėmesį, kad kryžmai neužkrėstumėte atskirų pacientų mėginių.
27. Išsiurbkite arba atsargiai išpilkite iš latakėlių visą skystį. Nupilant skystį nitroceliuliozės testavimo juostelės lieka prikibusios prie latakėlio dugno. Skysčio likučius atsargiai nulašinkite ant sugeriamojo popieriaus.
28. 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 šviežio konjugato skiedinio (žr. lentelę).
29. Iš latakėlio išsiurbkite arba išpilkite visą skystį (žr. 6 punktą).
30. Pipete į atitinkamus inkubavimo latakėlius įlašinkite po 1,5 ml pasigaminto **konjugato skiedinio** ir **30 minučių** inkubuokite ant purtytuvo.
31. Išsiurbkite arba išpilkite iš latakėlių visą skystį.
32. 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 to **1 x 1 minutę** plaukite **dist. (dejonizuotu) vandeniu**.
33. Iš latakėlio išsiurbkite arba išpilkite visą skystį (žr. 6 punktą).
34. Pipete į latakėlius įlašinkite po 1,5 ml paruošto naudoti **substrato tirpalo** ir **10 ± 3 minutes** ryškinkite ant purtytuvo.
35. Spalvos ryškinimą **sustabdykite** nupildami substrato tirpalą. Po to juosteles be tarpinio inkubavimo **3 x** nuplaukite su po 1,5 ml **dist. (dejonizuoto) vandens**.
36. Nupilkite dist. (dejonizuotą) vandenį ir išdžiovinkite juosteles ant švaraus, gerai sugeriančio popieriaus. Foninė spalva, kuri gali matytis ant drėgnų nitroceliuliozės testavimo juostelių, juostelėms išdžiūvus visiškai pradingsta. Sustiprintos nitroceliuliozės testavimo juostelės džiūsta šiek tiek ilgiau nei įprastinės nitroceliuliozės testavimo juostelės.
37. Vertinimui naudokite pridėtą vertinimo protokolą. Sužymėjus labai specifines spektro juostas protokolo lape Jums bus daug lengviau įvertinti pacientų mėginius.

Testavimo schemą žr. paskutiniame puslapyje

8.4 Imunobloto procesorių naudojimas

Automatizuotam blotų ir LINE apdorojimui validuoti tokie prietaisai: „Apollo“ ir „Profiblot“. Principiniai tinkami naudoti yra visi įprastiniai 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 ženklinimo 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.

Kontrolinių serumo ir konjugato spektro juostų padėtis nurodyta protokolo lape.

9.1 Paciento mėginių vertinimas

Reaktyvių spektro juostų padėtis ir ženklinimas 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 įvertinimui:

Pasirodančios spektro juostos	Spektro juostų intensyvumo įvertinimas
--------------------------------------	---

> ribinės vertės spektro juostą (PT)	teigiamas (+)
= ribinės vertės spektro juostai (PT)	ribinis (+/-)
< ribinės vertės spektro juostą (PT)	neigiamas (-)

9.3 Antigenų reikšmė

Naudotų, išvalytų (natūralus PT ir FHA) ir rekombinuotų (CatACT) *Bordetella pertussis* antigenų, gautų iš Tohama I fazės štamo, aprašas.

Antigenas / pavadinimas	Antigenų reikšmė	Antikūnų specifiškumas LINE
PT 28kDa	Kokliušo toksinas (PT) yra eksotoksinas, sudaromas tik <i>B. pertussis</i> ir todėl jis yra labai specifinis šiam ligos sukėlėjui. Jį sudaro fermentiškai aktyvus A subvienetas (Subunit S1) ir receptorius surišantis B subvienetas. Aceliulinės vakcinos dalis ir antikūnai prieš PT skiepų serumuose rodo glaudžiausią sąryšį su apsauga nuo <i>B. pertussis</i> infekcijos. <i>Bordetella</i> diagnostikai IgG tyrimu iš atskiro serumo PT yra didžiausio jautrumo ir specifiškumo po > 98 % antigenas. Todėl kokliušo toksinas gali būti vadinamas <i>B. pertussis</i> infekcijos žymens baltymu. IgA ir IgM tyrime antikūnų atsakas į PT yra tik maždaug 40–50 % kokliušo atvejų (4, 5).	Labai specifinis <i>B. pertussis</i>
CatACT 43kDa	Adenilato ciklazės toksinas (ACT) yra antigenas, kurio nebūna <i>B. pertussis</i> vakcinose. Jis yra esminis <i>B. pertussis</i> virulentiškumo faktorius (6). Kryžminis viso ACT baltymo reaktyvumas su RTX toksinų šeimos nariais – įskaitant <i>E. coli</i> hemoliziną (7, 8, 9, 10), – kuriuose tačiau nėra fermentinio adenilato ciklazės vieneto, yra visuotinai žinomas. Dėl šios priežasties „ <i>B. pertussis</i> + CatACT LINE“ naudojama tik N-terminalinį 400 AR ilgio ACT antigeno dalį (vadinamą CatACT), kuriame yra katalitinis domenas, specifinis <i>Bordetella</i> sp.. CatACT yra geriausias IgG tyrimo infekcijos žymuo serologinei diagnostikai, kuriam nedaro poveikio skiepų statusas. Diagnostikos momentu 68,0 % kultūrai teigiamų pacientų IgG tyrime buvo seroteigiami CatACT atžvilgiu. Pasirodė, kad CatACT po PT yra antras pagal jautrumą žymuo (11). Todėl vienu metu įrodžius antikūnų prieš CatACT ir PT buvimą galima teigti apie tikėtiną ūmią arba neseniai persirgtą infekciją.	Specifinis <i>Bordetella</i> sp.
FHA 220kDa	Filamentinis hemagliutininas (FHA) yra paviršinis <i>Bordetella pertussis</i> baltymas. Jis ligos sukėlėjui yra svarbus adhezinas (4). Antikūnų atsakas į FHA, ypač maždaug 80–90 % IgG tyrime, yra labai didelis; IgA ir IgM tyrime jis yra maždaug 50–60 % (4, 5). Pastaruoju metu įvairūs nepriklausomi tyrimai (3, 12, 13) parodė, kad egzistuoja kryžminis <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> ir kitų bakterinių ligų sukėlėjų FHA reaktyvumas.	Mažiau specifinis

9.4 Vertinimo kriterijai

Interpretuojant serologinius rezultatus visada reikia atsižvelgti ir į bendrą klinikinį vaizdą, epidemiologinius duomenis ir kitų turimų laboratorinių tyrimų rezultatus.

Rekomenduojamas IgG ir IgA įvertinimas

PT	CatACT	Reikšmė	Interpretavimas <i>B. pertussis</i>
-	- +/- +	<i>Bordetella pertussis</i> infekcijos požymių nėra. Galima nuoroda į <i>B. parapertussis</i> infekciją (žr. toliau).	neigiamas

+/-	- +/- +	Yra labai ankstyvos arba jau prieš ilgesnį laiką buvusios <i>B. pertussis</i> infekcijos galimybė. Rekomenduojama patikrinti su antru serumu.	ribinis
+	-	Nuoroda į šviežią arba neseniai persirgtą <i>Bordetella pertussis</i> infekciją. Patikrinkite skiepavimo istoriją	teigiamas
+	+/- +	Aiški nuoroda į šviežią arba neseniai persirgtą <i>Bordetella pertussis</i> infekciją.	

Papildoma nuoroda į *B. parapertussis* infekciją IgG ir IgA tyrime:

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

Teigiamas atsakas į CatACT ir FHA be atsako į PT gali būti interpretuojamas kaip nuoroda į *B. parapertussis* infekciją.

B. parapertussis infekcijos įtarimo patvirtinimui mes rekomenduojame po 7 dienų patikrinti antrą serumą; šiuo atveju turi ir toliau nebūti įrodoma jokių antikūnų prieš PT. Vietoj to galima atlikti *B. parapertussis* PGR.

FHA spektro juosta: Vien tik antikūnų prieš nespecifinį grupės antigeną 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 ligų sukėlėjais, arba persistuojantys antikūnai (dėl skiepų susidarę antikūnai arba senesnės infekcijos antikūnai).

Nagrinėjant serologinius *Bordetella* rezultatus, kuriuose atsižvelgiama į FHA, galima vertinti ir LINE FHA spektro juostą, žr. *B. parapertussis*. Tam FHA spektro juosta vertinama pagal ribinės vertės kontrolės PT spektro juostos intensyvumą:

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

Nuoroda: IgA ir IgM antikūnai sudaromi ne visada ir todėl jie yra ne toks patikimas *Bordetella pertussis* infekcijos žymuo IgG antikūnai.

9.5 Testo ribos

1. Neigiamas bloto rezultatas negali visiškai paneigti *Bordetella pertussis* infekcijos galimybės. Mėginys gali būti buvęs paimtas prieš susidarant antikūnams arba antikūnų titras yra žemiau testo jautrumo ribos.
2. Iš nuolatinio antikūnų būvimo 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 „inversines“ spektro juostas (tamsus fonas, baltos juostos); jų vertinti negalima, t. y., tokiu atveju imunobloto įvertinti neįmanoma. Serumą 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:

Mėginių inkubavimas	30 minučių	15 µl paciento serumo (plazmos) / 100 µl kontrolės, kiekvienas 1,5 ml skiedimo (plovimo) buferyje
Plovimas	3 x 5 minutes	Kiekvieną kartą su 1,5 ml skiedimo (plovimo) buferio
Konjugato inkubavimas	30 minučių	Su 1,5 ml paruošti naudoti skiedinio (1 + 100)
Plovimas	3 x 5 minutes 1 x 1 minutę	Kiekvieną kartą su 1,5 ml skiedimo (plovimo) buferio Su dist. (dejonizuotu) vandeniu
Substrato inkubavimas	10 ± 3 minučių	Kiekvieną su 1,5 ml substrato tirpalo
Fiksavimas	3 x be tarpinio inkubavimo	Kiekvieną kartą su 1,5 ml dist. (dejonizuoto) vandens

Konjugato skiedimo lentelė: (suapvalinta)

Juostelių skaičius	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 tūris	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 skaičius	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 tūris	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 skaičius	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 tūris	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 skaičius	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 tūris	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