

SeroPertussis™ Toxin IgG



ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) pro kvantitativní stanovení specifických protilátek IgG proti *Bordetella Pertussis Toxinu* v lidském séru.

Návod k použití

Testovací souprava pro 96 stanovení (Katalogové č. 1231-01)

Skladujte při 2–8°C. **Nezmrazujte.**

Pouze pro *In Vitro* stanovení.

Pouze pro profesionální použití

Dovází: GALI spol. s r.o.

Ke Stadionu 179, Semily 513 01

Tel. 481 689 050

Fax. 481 689 051

E-mail: info@gali.cz

Vyrábí: Savyon Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel. +972.8.8562920

Fax. +972.8.8523176

E-mail: support@savondiagnositics.com

Použití

Souprava SeroPertussis Toxin™ IgG slouží pro kvantitativní stanovení specifických IgG protilátek v séru nebo plazmě proti *Bordetella pertussis* Toxinu metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay).

Pro *In Vitro* diagnostické použití.

Úvod

Černý kašel (Pertussis) je vysoce nakažlivá bakteriální infekce respiračního traktu, způsobená *Bordetellou pertussis* – gram-negativní bakterií, výhradním lidským patogenem, který může jedince nakazit v každém jeho věku. Přenos původce tohoto onemocnění do organismu probíhá prostřednictvím vzduchových kapének, které jsou do okolí šířeny kašlem a kýcháním nakažené osoby. U 90% vnímavých jedinců se po expozici vyvine klinicky významné onemocnění. I přes rozsáhlé očkování dětí po několik desetiletí, zůstává černý kašel jednou z nejčastějších světových příčin úmrtí (1,2). Nejzávažnější onemocnění se vyskytuje u neimunizovaných kojenců a malých dětí, kteří jsou nejzranitelnější skupinou s nejvyšší mírou komplikací a úmrtí. Nemoc je obvykle mírnější u dospívajících a dospělých, kteří tvoří rezervoár a jsou zdrojem šíření pro malé děti. (3).

Epidemiologie:

Černý kašel je endemické onemocnění, ale epidemie se vyskytují každých 3-5 let. V USA je hlášeno 5000-7000 případů ročně. Bylo zjištěno, že 21% dospělých jedinců v USA, kteří trpěli protražovaným kašlem, (trvajícím více než

2 týdny) byli infikováni pertusí (4). Odhady WHO ukazují, že v roce 2008 se ve světě vyskytlo 16 milionů případů onemocnění, z nichž 95% připadá na rozvojové země. Na toto onemocnění zemřelo 195 000 dětí (5). Od roku 2011 byl opakovaně hlášen vzestup počtu případů onemocnění pertusí v různých částech světa, a to dokonce i v zemích, kde je dlouhodobě vysoké procento proočkované populace. V Evropě se situace vyvíjí podobně jako v ostatních zemích světa, kde je pozorován vzestup počtu případů onemocnění především u kojenců, adolescentů a dospělých jedinců (6).

Imunizace & Vakcinace:

Zatímco v rozvojovém světě se ví jen velmi málo o době trvání a ochraně jedinců po očkování proti pertusi, několik studií provedených v industrializovaném světě ukazuje, že účinnost očkování se snižuje po 4 – 12 letech (7,8). Infekce způsobuje u očkováných jedinců mírné nespecifické příznaky bez typických klinických stádií černého kašle. U očkováných jedinců se jedná pouze o 6% případů charakterizovaných nespecifickým, prolongovaným kašlem trvajícím několik týdnů až měsíců. Díky těmto atypickým příznakům nebývá u dospělých a adolescentů tato infekce často odhalena, a proto se tyto osoby stávají zdrojem nákazy pro neočkované děti (4,6,9).

Management:

Včasná antimikrobiální léčba snižuje závažnost klinických příznaků a zkracuje období možného přenosu infekce. Včasný záchyt případů onemocnění může výrazně pomoci v prevenci této nákazy, a to především u neočkovaných jedinců.

Pertusová diagnostika:

Laboratorní diagnostika pertuse může být provedena buď pomocí přímých metod, jako je PCR nebo pomocí nepřímých sérologických metod, které zjišťují specifickou protilátkovou odpověď. Pokud se bakterie v období prvních 3 týdnů infekce vyskytuje v horních cestách dýchacích, může být detekována pouze pomocí přímých metod (10,11, 12). Doporučovány jsou sérologické testy ELISA, které jsou zaměřené na detekci protilátek proti toxinu černého kašle a to především z toho důvodu, že touto metodou lze rozlišit infekci *B. pertussis* a *B. parapertussis* (13). Jednoznačná změna titru protilátek (dvojnásobný vzestup či pokles ve třídě IgG) mezi párovými séry je považován za spolehlivý indikátor akutní infekce, pokud v minulém roce nedošlo k očkování (13,14). Nicméně, v mnoha případech je první vzorek séra odebrán příliš pozdě na to, aby bylo možné ve druhém odebraném vzorku zjistit signifikantní změnu v titru protilátek. Proto se v klinické praxi běžně používá testování pouze jednoho vzorku séra (13, 14, 15, 16). Koncentrace protilátek proti antigenům *B. pertussis* mohou být kvantitativně vyjádřeny v mezinárodních jednotkách na mililitr (IU/ml). K dispozici jsou i referenční přípravky.

Souprava SeroPertussis Toxin™ IgG využívá jako antigen purifikovaný Pertussis Toxin (PT) umožňující kvantitativní stanovení IgG protilátek proti Pertussis Toxinu dle prvního Mezinárodního WHO Standardu (WHO International Standard Pertussis Antiserum, human, 1st IS NIBSC Code 06/140) (17).

Princip testu.

- Mikrotitrační destička je kautovaná obohacenou frakcí *Bordetella pertussis* Toxinu.
- Testované sérum, ředění 1/101, se inkubuje v jamkách mikrotitrační destičky. Specifická protilátka přítomná v séru pacienta se naváže na antigen navázaný na mikrodestičce.

- Nespecifické protilátky jsou odstraněny promytím.
- Dále se přidává křenová peroxidáza (HRP) konjugovaná s anti-lidskou IgG. Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen-protilátka, HRP značená protilátka se naváže na tento komplex.
- Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím.
- V dalším kroku je do jamek přidáván TMB substrát (chromogenní substrát), který je hydrolyzován peroxidázou, při pozitivní enzymatické reakci se vytvoří modré zbarvení.
- Enzymatická reakce je ukončena stop činidlem (1M H₂SO₄). Modré zbarvení se změní na žluté. Absorbance se měří při 450/620 nm.
- Hodnota absorbance je proporcionálně úměrná hladině specifických protilátek navázaných na kautované antigeny.

Přehled kroků: Manuálně/Automatizovaně*

Do mikrotitračních jamek, které jsou pokryty specifickými immunodominantními *B. pertussis* Toxin proteiny, přidejte 100 µl každého kalibrátoru připraveného k použití (C10,C20,C40), 100µl negativní kontroly, pozitivní kontroly a 100 µl 1/101 naředěných vzorků

↓

destičku přikryjte a inkubujte 1h při 37°C ve 100% vlhkosti

↓

5x promyjte promývacím pufrem

↓

přidejte 100µl HRP konjugátu připraveného k použití

↓

destičku přikryjte a inkubujte 1h při 37°C ve 100% vlhkosti

↓

5x promyjte promývacím pufrem

↓

přidejte 100µl TMB-Substrátu

↓

Destičku přikryjte a inkubujte 15min při laboratorní teplotě

↓

přidejte 100µl Stop roztoku

↓

Absorbanci odečítejte při 450/620nm

↓

Vypočítejte a interpretujte výsledky

*Automatizovaný postup:

Inkubace vzorku: 25 minut při laboratorní teplotě následovaná další 35 minutovou inkubací při 35°C.

Inkubace s konjugátem: 15 minut při laboratorní teplotě následovaná další 35 minutovou inkubací při 35°C.

Promývací kroky: 5 promývacích cyklů

Součásti kitu: pro Manuální/Automatizované použití

Souprava na 96 stanovení

Kat. číslo. 1231-01

1. **Mikrotitrační destička kautovaná antigenem *B. pertussis* Toxin:** 96 odlamovatelných jamek (8x12) kautovaných antigeny *Bordetella pertussis* Toxin, zabalené v hliníkové fólii se sušidlem. **1 destička**
2. **Koncentrovaný promývací pufir (20X):** PBS - Tween pufir. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku. **1 lahvička, 100ml**

3. **Roztok k ředění sér:** Roztok pufru, v pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku. **2 lahvičky, 60ml**
4. **Pozitivní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum s obsahem IgG protilátek proti *B. pertussis* Toxinu. Obsahuje konzervanty bez obsahu mědi a azidů. **1 lahvička, 2 ml**
5. **Negativní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum bez obsahu IgG protilátek proti *B. pertussis* Toxinu. Obsahuje konzervanty bez obsahu mědi a azidů. **1 lahvička, 2 ml**
6. **C30 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 30 IU/ml (arbitrary international units) specifických lidských IgG protilátek proti *B.pertussis* Toxinu. Obsahuje konzervanty bez obsahu mědi a azidů. **1 lahvička, 2 ml**
7. **C60 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 60 IU/ml (arbitrary international units) specifických lidských IgG protilátek proti *B.pertussis* Toxinu. Obsahuje konzervanty bez obsahu mědi a azidů. **1 lahvička, 2 ml**
8. **C120 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 120 IU/ml (arbitrary international units) specifických lidských IgG protilátek proti *B.pertussis* Toxinu. Obsahuje konzervanty bez obsahu mědi a azidů. **1 lahvička, 2 ml**
9. **HRP konjugát:** V pracovní koncentraci. Křenová peroxidáza (HRP) konjugovaná s anti-lidským IgG (γ řetězec specifický). Obsahuje konzervanty bez obsahu mědi a azidů. **1 lahvička, 15 ml**
10. **TMB substrát:** v pracovní koncentraci, obsahuje 3, 3',5, 5'- tetramethylbenzidin jako chromogen a peroxid jako substrát. **1 lahvička, 16 ml**
11. **Stop roztok:** V pracovní koncentraci. Obsahující 1M H₂SO₄. **1 lahvička, 16ml**
12. **Fólie na přikrytí destiček:** **1**
13. **Návod k použití:** **1**
14. **CD** **1**

Potřebný materiál, nedodávaný v soupravě

1. naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta.
2. vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000 µl) a špičky.
3. jednolitrová volumetrická láhev.
4. 50 ml odměrný válec.
5. promývací nádoba.
6. filtrační papír.
7. vortexové míchadlo.
8. vodní lázeň s víčkem (37°C) nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37°C).
9. ELISA reader s filtrem 450/620nm.
10. Destilovaná či dvakrát deionizovaná voda.

Upozornění

Pouze pro in vitro diagnostické použití

1. Tato souprava obsahuje lidská séra, která byla testována technikami podle FDA a CE. Séra jsou negativní na antigen HBsAg a na protilátky proti HCV a HIV. Nicméně jelikož žádná známá metoda nemůže zaručit s úplnou jistotou, že výrobky derivované z lidské

krve nepřenáší infekci, proto se musí se všemi komponenty z lidské krve, obsaženými v této soupravě, zacházet jako s potencionálně infekčním sérem nebo krví, způsobem identickým (nebo podobným) s doporučením publikovaným v CDC/NIH manuálu „Biobezpečnost mikrobiologických a lékařských laboratoří“, 1988.

2. Roztok TMB substrátu působí dráždivě na pokožku a mukózní membrány. Vyvarujte se přímého kontaktu.
3. Všechny součásti kitu jsou kalibrovány na danou šarži. Kombinování součástí kitů různých šarží může ovlivnit výsledek stanovení.
4. Kyselina sírová (1M, H₂SO₄) je pro oči a pokožku dráždivá. V případě kontaktu s oční sliznicí vyplachujte oko proudem vody a vyhledejte lékaře.

Uchovávání a trvanlivost reagensů

1. Všechny dodávané materiály je nutno skladovat při teplotě 2 až 8°C. Reagencie uchovávané při teplotě 2 až 8°C, jsou stabilní do data expirace vyznačeného na obalu soupravy. Expozice složek soupravy laboratorní teplotě po dobu několika hodin nezpůsobí zničení reagensů. **Reagencie nezmrazujte.**
2. Životnost kitu po otevření je 90 dní.
3. Nepoužité stripy musí být uzavřeny do hliníkového sáčku se sušidlem.
4. V koncentrovaném promývacím pufru 20x se mohou během chlazení tvořit krystalky. Toto je naprosto normální. Krystalky rozpustíte zahřátím pufru na 37°C ještě před jeho ředěním. Naředěný pufr může být uchováván při 2-8°C, a to po dobu maximálně 21 dní.

Odběr vzorků

Vzorky séra se odebírají asepticky standardními technikami. Tepelně inaktivovaná séra nemohou být použita. Nedoporučuje se použití lipemických, zakalených a kontaminovaných séra. Drobné částice a sraženiny v séru mohou způsobovat chybné výsledky. Tyto vzorky by měly být před stanovením vyčefeny centrifugací nebo filtrací.

Skladování vzorků

Vzorky by se měly skladovat při teplotě 2-8°C pokud jsou testovány během 7 dní (doporučuje se přidávek 0,1% azidu sodného). Pro delší uchování je nutno alikvoty séra uchovávat při teplotě -20°C. Vyhněte se opakovanému mrazení a rozmrazování séra.

Pracovní postup pro Manuální použití

A. Příprava reagensů

1. Všechny testovací reagenty před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte kalibrátory (C30, C60, C120), negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky séra.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuty: 3 jamky pro kalibrátory (C30, C60, C120) a jedna jamka pro negativní kontrolu. Testování pozitivní kontroly je volitelné.
3. Vyjměte mikrodestičku z hliníkové fólie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných

vzorků) z 96 jamkového rámečku. Nepoužité stripy musí být vráceny do hliníkového sáčku se sušidlem. Sáček je nutno důkladně uzavřít.

4. Zředte koncentrovaný promývací pufr v poměru 1/20 deionizovanou nebo destilovanou vodou. Pro příklad: pro přípravu 1 L promývacího pufru přidejte k 50 ml koncentrovaného roztoku promývacího pufru 950 ml dvakrát deionizované nebo destilované vody.

B. Inkubace vzorků séra a kontrol.

5. Naředte každý vzorek pacienta v poměru 1/101 následovně: přidejte 10μl séra pacienta k 1000μl roztoku pro ředění séra.
6. Pipetujte 100μl každého ze tří kalibrátorů (C30, C60, C40), negativní kontroly, pozitivní kontroly a séra do příslušných jamek na stripu.
7. Přikryjte strip víčkem a dejte inkubovat na 1 hodinu do mlžné komory (37°C).
8. Odstraňte přebytečnou tekutinu z jamek.

9. Promývací krok:

Ruční promývání:

Naplňte každou jamku promývacím pufrům po okraj a poté tekutinu odstraňte. Promytí opakujte 5x.

Automatické promývání:

Naplňte každou jamku promývacím pufrům (350μl) po okraj a poté tekutinu odstraňte. Promytí opakujte 5x.

10. Osušte stripy a rámeček jemným poklepáním na absorpčním papíru.

C. Inkubace s konjugátem.

11. Pipetujte 100 μl konjugátu (připraven k použití) do každé z jamek.
12. Přikryjte strip víčkem a inkubujte 1 hodinu při 37°C v mlžné komoře.
13. Odstraňte přebytečnou tekutinu z jamek a proveďte promývací krok tak, jak je uvedeno v bodě 9-10.

D. Inkubování s TMB Substrátem.

14. Pipetujte 100 μl TMB Substrátu do každé z jamek, přikryjte víčkem a inkubujte při laboratorní teplotě **15 min.**
15. Reakci ukončete přidáním 100 μl stop roztoku (1 M H₂SO₄) do každé z jamek.

E. Odečtení výsledků.

16. Proměřte absorbanci při 450/620 nm a výsledek zapište. Odečtení může být provedeno do 30 min od zastavení chromogenní reakce.

Pozn.: Před odečtením nesmí jamka obsahovat žádné bublinky. Dno destičky musí být opatrně otřeno

Pracovní postup pro Automatizované použití

Objemy lahviček a reagensů byly uzpůsobeny pro automatizované použití.

A. Příprava reagensů.

1. Všechny testovací reagenty a vzorky před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte kalibrátory (C30, C60, C120), negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky séra.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření

zahrnutý tři jamky pro kalibrátory (C30, C60, C120) a jedna jamka pro negativní kontrolu. Testování pozitivní kontroly je volitelné.

3. Vyjměte mikrodestičku z hliníkové folie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných vzorků) z 96 jamkového rámečku.
4. Zřeďte 1/20 koncentrovaný promývací pufr deionizovanou nebo destilovanou vodou. Pro příklad: pro přípravu 1L promývacího pufru přidejte k 50ml koncentrovaného roztoku promývacího pufru 950ml dvakrát deionizované nebo destilované vody.

B. Inkubace vzorků sér a kontrol.

5. Naředte každé sérum pacienta v poměru 1/101 následovně:
 - Odpipetujte 750µl roztoku na ředění sér do každé zkumavky na vzorky.
 - Aspirujte 250 µl roztoku na ředění sér a 10 µl vzorku séra.
 - Přidejte 260 µl (předředěného vzorku v poměru 1:26) do každé zkumavky (konečný objem v každé zkumavce na vzorky musí být 1010 µl).
6. Pipetujte 100 µl negativní kontroly, pozitivní kontroly, tři kalibrátorů (C30, C60, C120) a 1:101 naředěných vzorků sér do příslušných jamek na stripu.
7. Inkubujte 25 min. při laboratorní teplotě (22 – 28 °C). Čas inkubace je měřen od prvního pipetování tak, jak je uvedeno v automatickém programu: „*Time incubation from start of previous assay step*“. Po inkubaci při 22 – 28 °C pokračujte dále v inkubaci při 35°C po dobu 35 minut.
8. Eliminujte „assay drift“, který může být způsoben předchozími kroky.
9. **Promývací krok:** Proveďte 5 promývacích cyklů za využití 500µl promývacího pufru.
10. Proveďte 2 aspirační cykly pro vysušení zbytkové tekutiny tak, jak je uvedeno v automatickém programu: „*Perform 2 aspirate cycles no aspirate sweep. Partial plate mode: maintain full plate time*“.

C. Inkubace s konjugátem.

Každá lahvička s HRP Konjugátem může být použita pouze dvakrát

11. Pipetujte 100µl HRP konjugátu připraveného k použití do každé jamky.
12. Inkubujte 15 min. při laboratorní teplotě (22 – 28 °C). Čas inkubace je měřen od prvního pipetování tak, jak je uvedeno v automatickém programu: „*Time incubation from start of previous assay step*“. Po inkubaci při 22 – 28 °C pokračujte dále v inkubaci při 35°C po dobu 35 minut.
13. Proveďte promývací krok tak, jak je uvedeno v bodě 8-9.

D. Inkubování s TMB-substrátem.

14. Odpipetujte 100µl roztoku TMB-Substrátu do každé z jamek a inkubujte při laboratorní teplotě (22-28 °C) **po dobu 15 min.** Čas inkubace je měřen od prvního pipetování tak, jak je uvedeno v automatickém programu: „*Time incubation from start of previous assay step*“.
15. Reakci ukončete přidáním 100 µl Stop roztoku (1M H₂SO₄) do každé z jamek.

E. Odečtení výsledků.

16. Proměřte absorbanci při 450/620 nm a výsledek zapište. Odečtení může být provedeno do 30 min. od zastavení chromogenní reakce.

Vezměte prosím na vědomí, že každý automatický přístroj má své specifické technické požadavky. Prosím aplikujte automatizovaný pracovní postup pro tuto soupravu do operačního protokolu Vašeho automatického přístroje.

Validita testu

Test je validní, jestliže jsou splněna následující kritéria. Pokud nejsou splněny tyto podmínky, není test validní a musí být zopakován.

1. C120: OD ≥ 1.3
C60: OD ≥ 0.9
C30: OD ≥ 0.5
2. Poměr OD C120 / OD C60: > 1.3
3. Poměr OD C60 / OD C30 > 1.3
4. Pozitivní kontrola: > 100 IU/ml (viz. Kapitola výpočet a interpretace výsledků)
5. Negativní kontrola: < 15 IU/ml (viz Kapitola výpočet a interpretace výsledků)

Výpočet výsledků


PRO RYCHLÝ VÝPOČET A INTERPRETACI VÝSLEDKŮ TESTU PROSÍM POUŽIJTE “MASTER INTERPRETATION FOR SeroPT“ (viz. příložený disk).

Výpočet výsledků testu lze provádět těmito metodami:

Manuální metoda za využití milimetrového papíru:

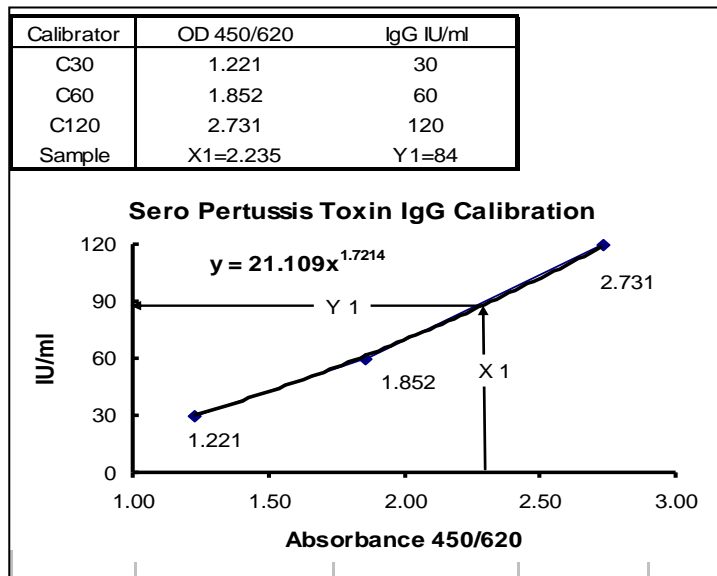
1. Vyneste hodnoty absorbance (OD) všech tří kalibračních standardů (C30, C60 a C120) na osu x proti jejich koncentracím v jednotkách IU/ml na ose Y.
2. Použitím standardní křivky odečítejte hodnoty testovaných vzorků (v jednotkách IU/ml) z naměřených absorbancí jednotlivých testovaných vzorků pacientů (viz př.1).

Počítačová metoda za využití MS Excelu (VYUŽIJTE PŘILOŽENÝ DISK)

1. Spustěte program MS Excel
2. Do sloupce B postupně zadejte hodnoty všech 3 kalibrátorů (30, 60, 120) a do sloupce A zadejte odpovídající hodnoty jejich absorbance (OD).
3. Klikněte na ikonu pro tvorbu grafů () a z nabídky vyberte xy bodový graf. Do grafu vyneste hodnoty sloupce B proti hodnotám sloupce A.
4. Pravým tlačítkem klikněte na jeden z bodů v grafu a vyberte "Přidat spojnici trendu".
5. Ve zobrazené tabulce vyberte možnost "Power" a v dolní části téže tabulky vyberte možnost "Zobrazit rovnici regrese". Klikněte na tlačítko OK.
6. V grafu se zobrazí rovnice ve tvaru $Y = aX^b$, kde Y odpovídá hodnotě koncentrace PT v IU/ml a X hodnotě absorbance při 450/620 nm (OD_{450/620}). Tuto rovnici použijte pro výpočet hodnot koncentrací PT dle odpovídajících hodnot OD každého ze vzorků (viz př.1).

Příklad 1. Interpolace výsledků:

Na osu X vyneste hodnotu absorbance vzorku (X1) a z tohoto bodu vyneste vertikální spojnici ke kalibrační křivce. Z daného bodu vedte horizontální spojnici k ose Y. Odečtěte koncentraci vzorku v IU/ml.



Excel: (Y) =21.109*2.235^1.7214

Interpretace výsledků

- Validita výsledků vzorků:** Pokud je hodnota absorbance (OD_{450/620}) daného vzorku ≥ 3.0 , je doporučeno takový vzorek znovu testovat při ředění 1:404. Následně by měl být výsledek v IU/ml vynásoben 4.
- Cut-off:** Dle nedávno publikované literatury a doporučení referenčních laboratoří v rámci EU (16, 17), doporučuje firma Savyon Diagnostics následující interpretaci výsledků:

| IgG IU/ml | Výsledek | Interpretace |
|-------------------------|------------------|---|
| < 40 IU/ml | Negativní | Neindikuje akutní infekci |
| ≥ 40 až <100 IU/ml | Hraniční | Možná infekce: opakujte testování IgG po 2-4 týdnech nebo testujte IgA |
| ≥ 100 IU/ml | Pozitivní | Indikuje akutní infekci nebo nedávny kontakt |

3. Testování rekonvalescentních vzorků séra:

Pokud nemůže být s určitostí stanovena diagnóza na základě testování jednoho vzorku séra (hraniční výsledky) a výsledky zcela nekorelují s klinickými příznaky, doporučuje firma Savyon Diagnostics zopakovat testování druhého (rekonvalescentního) vzorku séra odebraného po 2 – 4 týdnech (13, 15). V nedávno publikované literatuře je takové doporučení, že alespoň dvojnásobná změna v koncentracích IgG protilátek znamená přítomnost akutní infekce (13,14).

| IgG | IgA | Interpretace |
|-------------------------|--------------------------|--|
| Negativní | Negativní | Neindikuje žádnou infekci <i>B.pertussis</i> (viz omezení testu) |
| Hraniční | Negativní | Neindikuje nedávno prodělanou infekci |
| Hraniční nebo Negativní | Pozitivní | Indikuje nedávno prodělanou infekci |
| Pozitivní | Negativní nebo Pozitivní | Indikuje nedávno prodělanou infekci |

4. IgA testování a protilátkový profil:

V případě nemožnosti získat druhý (rekonvalescentní) vzorek séra a ve snaze získat celkový protilátkový profil, doporučuje firma Savyon Diagnostics testovat i hladiny IgA protilátek (13,15).

Omezení testu

- Jednotlivé sérologické testy nemohou být používány jako jediné kritérium pro stanovení diagnózy. Musí se brát v úvahu všechny klinické a laboratorní výsledky.
- Vzorky, které byly odebrány příliš brzo během primární infekce, nemusí obsahovat detekovatelné množství protilátek. Pokud je podezření na *B.pertussis*, měl by se během 2-4 týdnů odebrat další vzorek na analýzu. Ten by se měl testovat paralelně s prvním vzorkem.
- Pokud se infekce předpokládá u dětí mladších 6 měsíců, měla by se použít metoda pro detekci antigenu (kultivace, PCR), jelikož u dětí mladších 6 měsíců se zřídka tvoří protilátky.
- Sérologická diagnostika infekce *B. pertussis* nesmí být prováděna, pokud byl pacient očkovan v období 1 roku před vyšetřením.

Chování testu

Přesnost

Intra-assay (uvnitř - běhu) přesnost:






| Vzorek | Počet opakování | Střední hodnota OD | CV% |
|-----------|-----------------|--------------------|-----|
| 120 IU/ml | 10 | 119 | 3.5 |
| 30 IU/ml | 10 | 32 | 7.1 |

Inter-assay (mezi - běhy) přesnost:

| Vzorek | Počet opakování | Střední hodnota OD | CV% |
|-----------|-----------------|--------------------|-----|
| 120 IU/ml | 10 | 122 | 6.3 |
| 30 IU/ml | 10 | 30 | 9.4 |

Literatura

1. Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly epidemiological record; No. 40, 2010, 85, 385–400; www.who.int/wer.
2. Zepp F. et al. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe; *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11: 557–70.
3. Wendelboe AM. et al. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatric Infectious Disease Journal*; 2005, 24(Suppl. 5): S58-S61.
4. Mattoo S. & Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies; *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18:362-82.
5. Crowcroft NS. & Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet.* 2006; 367(9526):1926-36.
6. He Q. & Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence; *Future Microbiol.* 2008; 3(3):329-39.
7. Wright SW. et al. Pertussis infection in adults with persistent cough. *Journal of the American Medical Association.* 1995; 273:1044–1046.
8. Black RE. et al. for the Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF; Global regional and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis; *Lancet.* 2010; 375:1969–1987.
9. The Global Pertussis Initiative Meeting report from the Fourth Regional Roundtable Meeting, France, April 14–15; *Human Vaccines.* 2010; 7:4, 481-488; April 2011;
10. Srugo I. et al. Pertussis Infection in Fully Vaccinated Children in Day-Care Centers, Israel; *Emerging Infectious Diseases.* 2000; Vol. 6, No. 5 September-Oct.
11. ECDC TECHNICAL DOCUMENT; Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*; Version 1.0, October 2012.
12. HPA Guidelines for the Public Health Management of Pertussis. www.hpa.org.uk. October 2012.
13. Wirsing von Koenig CH et al. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10):4925-9.
14. ECDC TECHNICAL DOCUMENT; Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*; Version 1.0, September 2012.
15. Guiso N. et al. EU Pertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30:307–312.
16. Wirsing von Koenig CH et al. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis*. *J. Clin. Micro.* 2010; 48(12); 4459-4463.
17. He Q. et al. EUVAC. NET collaborative study: evaluation and standardization of serology for diagnosis of pertussis. *J Immunol Methods.* 2011; 372(1-2):137-45.
18. Xing D. et al. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(3):303–311.

| | |
|--|--|
|  | Teplotní omezení |
|  | Čtěte návod k použití |
|  | Prostředek pro <i>in vitro</i> diagnostiku |
|  | Výrobce |
|  | Autorizovaný evropský distributor |



European Authorized Representative: Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels

Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net Mobile: +32.475.45.46.60