

# SeroPertussis™ IgG

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)  
pro stanovení protilátek IgG proti **Bordetelle  
Pertussis** v lidském séru.

**Testovací souprava pro 96 stanovení.**  
(Katalogové č. A231-01)

Skladujte při 2–8°C. **Nezmrazujte.**  
Pouze pro **In Vitro** stanovení.  
Pouze pro profesionální použití.

**Dováží: GALI spol. s r.o.**

Ke Stadionu 179, Semily 513 01  
Tel. 481 689 050  
Fax. 481 689 051  
E-mail: [info@gali.cz](mailto:info@gali.cz)

**Vyrábí: Savyon Diagnostics Ltd.**

3 Habosem St. Ashdod 77610  
ISRAEL  
Tel. +972.8.8562920  
Fax. +972.8.8523176

E-mail: [support@savondiagnosics.com](mailto:support@savondiagnosics.com)

## Použití

Tento test se používá pro semi-kvantitativní stanovení specifických IgG protilátek proti *Bordetelle Pertussis* ve vzorku lidského séra metodou ELISA..

Pro **In Vitro** diagnostické účely. Pouze pro profesionální použití.

## Úvod

Černý kašel (Pertussis) je vysoce nakažlivá bakteriální infekce respiračního traktu, způsobená *Bordetellou pertussis* – gram-negativní bakterie.

U dětí se typicky projevuje záchvatovým, křečovitým kašlem a zvracením po kašli. Tyto stavy přetrvávají mnoho týdnů.

Černý kašel je endemické onemocnění, ale epidemie se vyskytují každých 3-5 let. V USA je hlášeno 5000-7000 případů ročně. Výskyt černého kašle byl rapidně omezen hromadným očkováním. Nicméně i v zemích, ve kterých je očkování vysoce rozšířeno, se onemocnění objevuje <sup>(1)</sup>. Celosvětově je diagnostikováno téměř 50 miliónů případů černého kašle a okolo 350 000 lidí na tuto chorobu umírá <sup>(2)</sup>. Výskyt černého kašle stoupá postupně od roku 1980 <sup>(3)</sup>. Uměle získaná imunita po očkování se po 5-10 letech ztrácí, a očkování hostitel se stává k infekci náchylným. Infekce se u očkováných lidí projevuje jako mírnější nespecifické onemocnění, bez klasické klinické fáze. Černý kašel je patrný pouze v 6% takových případů. Onemocnění se projevuje nespecifickým, několik týdnů až měsíců, přetrvávajícím kašlem. Vzhledem k těmto atypickým symptomům, je diagnostika černého kašle u dospělých a

dospívajících značně podhodnocena. Tyto jedinci mohou být zdrojem infekce pro neočkované kojence <sup>(4)</sup>. Pro děti, které jsou příliš mladé, na to aby byly kompletně očkovány, a pro děti, které ještě nedostaly sérii primárních očkování. Tam je riziko onemocnění vysoké.

Onemocnění je velice nakažlivé, u více než 90% jedinců, dojde po expozici v domácím prostředí ke klinickému onemocnění.

Časná anti-mikrobiální léčba redukuje sílu symptomů, a omezuje periodu nakažlivosti. Časná identifikace případů může pomoci při prevenci, neočkovaných lidí nebo lidí očkováných před dlouhou dobou. Používá se anti-mikrobiální prevence a nebo očkování.

Laboratorní diagnostika černého kašle se provádí: přímo kultivací, DFA nebo PCR a nepřímo serologickými testy. Během prvních dvou týdnů infekce, může být bakterie v horním dýchacím traktu prokázána pouze přímou metodou. Pro přímou metodu se preferují nasofaryngeální vzorky (odsáté nebo na tampónu). Serologické testy jsou užitečné při diagnostice atypických infekcí, s přetrvávajícím kašlem, a pro epidemiologické účely. Zvýšené hladiny protilátek proti Pertussis Toxin (PT) a Filamentous Hemagglutinin (FHA) jsou považovány za citlivé serologické markery pro diagnostiku dospělých a neočkovaných dětí <sup>(5)</sup>. U neočkovaných dětí je nutné, zvýšené hladiny protilátek jak imunoglobulinu G (IgG) tak imunoglobulinu A (IgA), posílat k WHO k definitivnímu potvrzení diagnostiky černého kašle. U očkováných dětí postačí k diagnostice černého kašle jeden vzorek séra <sup>(6)</sup>.

Test SeroPertussis™ IgG a Test SeroPertussis™ IgA/IgM se používají k doplnění PT a FHA (antigen) testů. Umožňují kvalitativní stanovení IgA a / nebo IgM protilátek a semi-quantitativní stanovení IgG protilátek k *Bordetelle pertussis*.

## Princip testu.

- Mikrotitrační destička je kautovaná obohacenou frakcí toxinu *bordetelly pertussis* a vláknitým hemagglutininem.
- Testované sérum, ředění 1/100, 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 protilátka a vytvoří komplex.
- Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím.
- V dalším kroku je do jamek přidáván chromogenní substrát, který při pozitivní enzymatické reakci vytvoří modré zbarvení.
- Enzymatická reakce je ukončena stop činidlem (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). 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

Do mikrotitračních jamek, které jsou pokryty specifickými immunodominantními *B. pertussis* proteiny, přidejte 50 µl každého kalibrátoru (P10, P50, P75), a 50 µl 1/100 naředěné negativní kontroly, pozitivní kontroly, vzorků

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

↓  
3x promyjte promývacím pufr

↓  
přidejte 50 µl HRP konjugátu naředěného v poměru 1/300

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

↓  
3x promyjte promývacím pufr

↓  
přidejte 100 µl TMB-Substrátu

↓  
Destičku přikryjte a inkubujte 15min při laboratorní teplotě

↓  
přidejte 100 µl Stop roztoku

↓  
Absorbanci odečítejte při 450/620nm

↓  
Vypočítejte a interpretujte výsledky

## Součásti kitu

### Souprava na 96 stanovení

Kat. číslo. A231-01

1. **Mikrotitrační destička kautovaná antigenem *B. pertussis*:** 96 odlamovatelných jamek (8x12) kautovaných antigeny *Bordetella pertussis*, zabalené v hliníkové fólii se sušidlem.

**1 destička**

2. **Koncentrovaný promývací pufr (20X):** PBS - Tween pufr. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 100ml**

3. **Roztok k ředění sér-RT:** Roztok pufru, v pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 30ml**

4. **Roztok k ředění konjugátu:** V pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 40ml**

5. **Negativní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum bez obsahu IgG protilátek k *B. pertussis*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku..

**1 lahvička, 2 ml**

6. **Positivní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum pozitivní na IgG protilátky proti *B. pertussis*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 2 ml**

7. **P10 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 10 BU/ml (arbitrary binding units) specifických IgG protilátek proti *B. pertussis*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 2ml**

8. **P50 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 50 BU/ml (arbitrary binding units) specifických IgG protilátek proti *B. pertussis*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 2ml**

9. **P75 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 75 BU/ml (arbitrary binding units) specifických IgG protilátek proti *B. pertussis*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0.1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 2ml**

10. **Koncentrovaný HRP konjugát (300x):** anti-lidské IgG (Y řetězec specifický). S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.

**1 lahvička, 0.2ml**

11. **TMB substrát:** v pracovní koncentraci, obsahuje 3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidin jako chromogen a peroxid jako substrát

**1 lahvička, 14ml**

12. **Stop roztok:** V pracovní koncentraci. Obsahující 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**1 lahvička, 15ml**

13. **Fólie na přikrytí destiček:** 1

14. **Návod k použití:** 1

## Potřebný materiál, nedodávaný v soupravě

1. naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta
2. plastové zkumavky na jedno použití pro ředění HRP konjugátu
3. vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000 µl) a špičky
4. jednolitrová volumetrická láhev
5. 50 ml volumetrický válec
6. promývací nádoba
7. filtrační papír
8. vortexové míchadlo
9. vodní lázeň s víčkem (37± 1°C) nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37± 1°C)
10. reader s filtrem 450 / 620 nm pro měření mikrodestiček
11. destilovaná nebo dvakrát deionizovaná voda pro ředění promývacího pufru (Wash Buffer)

## Upozornění

### Pouze pro in-vitro diagnostické použití!

1. Tato souprava obsahuje lidská séra, která byla testována technikami podle FDA. Séra jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HCV a HIV, nicméně, jelikož žádná známá metoda nemůže zaručit s úplnou jistotou, že výrobky derivované z lidské krve nepřenesají infekci, se všemi komponenty z lidské krve, obsaženými v této soupravě se musí zacházet jako s potencionálně infekčním sérem nebo krví, způsobem identickým (nebo podobným) s doporučením publikovaným v CDC/NIH manuálu „Biobezpečnost mikrobiologických a lékařských laboratořích“, 1988.
2. Roztok chromogenního 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, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) je pro oči a pokožku dráždivá. V případě kontaktu s oční sliznicí, vyplachujte oko proudem vody.

#### 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 obvyklé teplotě po dobu několika hodin nezpůsobí zničení reagensů.  
**Reagencie nezmrazujte.**
2. Životnost kitu po otevření je 90 dní.
3. Nepoužité stripy se musí skladovat v hliníkové fólii společně se sušidlem.
4. V koncentrovaném promývacím pufru 20x se mohou během skladování tvořit krystalky. Toto je běžné. Krystalky rozpustíte zahřátím pufru na 37°C ještě před jeho ředěním. Naředěný pufr skladujte 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 vyčiřeny centrifugací nebo filtrací.

#### Skladování vzorků

Vzorky by se měly skladovat při teplotě 2-8°C pokud jsou testovány během 7 dní (doporučuje se přídavek 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 - Ruční

Aplikační listy pro automatické zpracování jsou na vyžádání

##### A. Příprava reagensů.

1. Všechny testovací reagenty před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte kalibrátory (P10, P50, P75), negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky séra.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuto měření: 3. kalibrátorů (P10, P50, P75) negativní kontroly, pozitivní kontroly.
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 1/20 koncentrovaný promývací pufr 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 1/100 následovně: přidejte 10 $\mu$ l séra pacienta k 190 $\mu$ l roztoku pro ředění sér-RT (1/20). A následně přidejte 25 $\mu$ l takto získaného roztoku 1/20 ke 100 $\mu$ l roztoku k ředění sér-RT.
6. Pipetujte 50 $\mu$ l každého ze tří kalibrátorů (P10, P50, P75), 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 přebytečné tekutiny z jamek.
9. **Promývací krok:**

**Ruční promývání:** naplňte každou jamku promývacím pufrům po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 3x.

**Automatické promývání:** naplňte každou jamku promývacím pufrům (300-350 $\mu$ l) po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 3x.

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

##### C. Inkubace s konjugátem.

11. Koncentrovaný roztok HRP-konjugátu IgG zředte do pracovní koncentrace těsně před použitím v poměru 1/300 roztokem Conjugate Diluent. Např. pro dva stripy připravte minimálně 3 ml zředěného HRP-konjugátu následovně: 10  $\mu$ l koncentrovaného roztoku HRP-konjugátu IgG a smíchejte s 3 ml roztoku Conjugate Diluent.
12. Odpipetujte 50  $\mu$ l zředěného konjugátu do každé z jamek.
13. Přikryjte strip víčkem a inkubujte 1 hodinu při 37°C v mlžné komoře.
14. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek a proveďte promývací krok, jak je uvedeno v bodě 9-10.

##### D. Inkubování s TMB-substrátem.

15. Odpipetujte 100  $\mu$ l roztoku TMB-Substrate do každé z jamek, přikryjte víčkem a inkubujte při laboratorní teplotě 15 min.
16. Reakci ukončete přidáním 100  $\mu$ l roztoku Stop roztoku (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) do každé z jamek.

##### E. Odečtení výsledků.

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

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

#### Validita testu

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

1. P75: OD  $\geq$  1.0
2. Poměr OD P50 / OD P10 je  $>$  1.6
3. Poměr OD P75 / OD P10 je  $>$  2.2
4. Negativní kontrola:  $<$  10 BU/ml (viz. Kapitola výpočet a interpretace výsledků)
5. Pozitivní kontrola:  $\geq$  30 BU/ml (viz. Kapitola výpočet a interpretace výsledků)

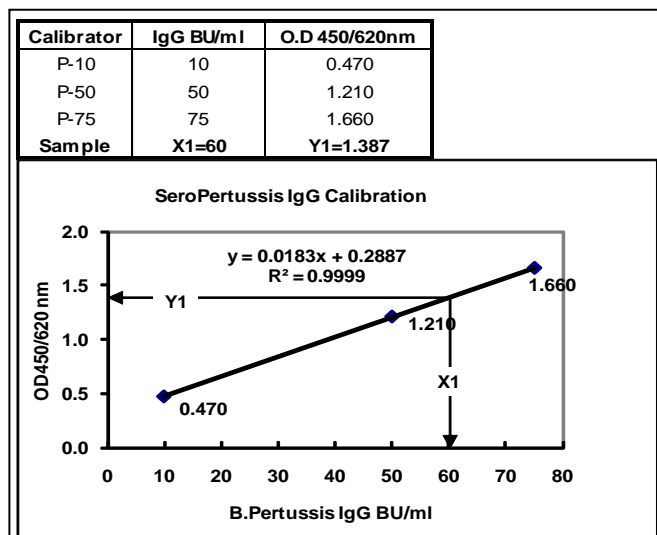
## Výpočet výsledků

### Manuální metoda, kde se používá milimetrový papír:

- Vynešte hodnoty absorbance (OD) všech tří kalibračních standardů (P10, P50 a P75) na osu y proti jejich koncentracím v jednotkách BU/ml na ose x.
- Vzniklými body vhodně proložte základní lineární křivku.
- Použitím standardní křivky odečtěte koncentraci pozitivní kontroly a negativní kontroly v BU/ml.  
Negativní kontrola by měla být <10BU/ml  
Positivní kontrola by měla být  $\geq 30$  BU/ml.  
Pokud kontroly nesplňují daná kritéria, test se musí opakovat.
- Použitím standardní křivky odečtěte hodnoty testovaných vzorků (v jednotkách BU/ml) z naměřených absorbancí jednotlivých testovaných vzorků pacientů (viz př.1).

### Příklad 1. Interpolace výsledků:

Na osu Y vynešte hodnoty absorbance vzorku (Y1) a nakreslete horizontální čáru ke kalibrační křivce. Z daného bodu vedte vertikální čáru k ose X. Odečtěte koncentraci vzorku v BU/ml.



## Interpretace výsledků

| IgG BU/ml                    | Výsledek  | Interpretace  |
|------------------------------|---|---|
| <10 BU/ml                    | Negativní<br>Nedetekovatelné IgG protilátky       | Neindikuje infekci<br><b>B.pertussis</b><br>(viz. limitace)                           |
| $\geq 10$ BU/ml<br><50 BU/ml | Positivní<br>Detekovatelná hladina IgG protilátek | Vypovídá o nedávné<br>nebo minulé infekci <sup>1</sup><br>nebo o minulé<br>immunizaci |
| $\geq 50$ BU/ml              | Silně pozitivní<br>Vysoká hladina IgG protilátek  | Vypovídá o nedávné<br>nebo minulé infekci   |

<sup>1</sup> Aby se rozlišilo mezi prodělanou a současnou infekcí, doporučuje se odebrat za 2-4 týdny druhý vzorek. Pokud hodnota BU/ml u druhého vzorku významně stoupne, jedná se o současnou infekci.  
Následující vzoreček slouží k posouzení významnosti změny titru párových sér:

$$R = \frac{BU2 + 15}{BU1 + 15}$$

**BU1** = koncentrace v BU/ml prvního vzorku

**BU2** = koncentrace v BU/ml druhého vzorku

Jestliže je  $R \geq 1.7$ , jedná se statisticky o významný rozdíl ( $p=0.005$ ). Tento poměr není platný, pokud je hodnota obou vzorků pod 10 BU/ml.

Pokud má jeden ze vzorků hodnotu nižší než -13 BU/ml, je změna o 1 BU/ml považována za dostatečnou.

## Ke získání kompletního protilátkového profilu, by mělo být testováno také IgM a IgA

Interpretace výsledků založených na detekci IgA, IgM a IgG protilátek.

| Bordetella Pertussis     |           |                          |  |
|--------------------------|-----------|--------------------------|--|
| IgG                      | IgM       | IgA                      |  |
| Negativní                | Negativní | Negativní                | Neindikuje infekci B.pertussis (viz. limitace)                 |
| Negativní nebo Positivní | Positivní | Negativní nebo Positivní | Vypovídá o současné infekci                                    |
| Positivní nebo Negativní | Negativní | Positivní                | Vypovídá o nedávné prodělané infekci                           |
| Positivní                | Negativní | Negativní nebo Positivní | Vypovídá o nedávné nebo minulé infekci nebo o minulé imunizaci |

## Omezení testu

- Jednotlivé serologické 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 mladší 6 měsíců se zřídka tvoří protilátky.

## Chování testu

### Přesnost

Intra-assay (uvnitř - běhu) přesnost:

| Vzorek  | Počet opakování | Střední hodnota OD | CV% |
|---------|-----------------|--------------------|-----|
| 50BU/ml | 10              | 48                 | 5.2 |
| 15BU/ml | 10              | 15                 | 2.5 |

Inter-assay (mezi - běhy) přesnost:

| Vzorek  | Počet opakování | Střední hodnota OD | CV% |
|---------|-----------------|--------------------|-----|
| 50BU/ml | 10              | 48                 | 7   |
| 15BU/ml | 10              | 15                 | 13  |

## Literatura

1. Melker H.E. et al., Emerging Infectious Diseases 6(4), 2000. Centers of Disease Control
2. Liberti G.E. (editor), Med Sci Bull. 19(3): 5. 1996
3. CDC report, February 1998
4. Srugo I. et al., Emerging Infectious Diseases 6(5), 2000. Centers for Diseases Control
5. Trollfors B. et al., Clinical Infectious Diseases 1999; 28; 552-9
6. Muller F-M.c. et al., J. Clin. Micro. 1997; 35(10); 2435-2443



**European Authorized Representative: Obelis s.a.**  
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels, Belgium  
Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03  
E-mail: [mail@obelis.net](mailto:mail@obelis.net)

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
|  | Temperature Limitation             |
|  | Consult instructions for use       |
|  | In Vitro Diagnostic Medical Device |
|  | Manufacturer                       |
|  | Authorized European Representative |