



# BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA®</sup> IgG

# BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA®</sup> IgA

Imunoanalytický test, in-vitro, pro detekci IgA a IgG protilátek proti Bordetella pertussis v lidském krevním séru nebo plazmě, využívající specifických antigenů.

## 1. POUŽITÍ TESTU

BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA®</sup> je kvalitativní *in vitro* test pro detekci IgG nebo IgA protilátek proti Bordetella pertussis v lidském séru nebo plazmě. Je užíván jako průkazný nebo konfirmační test pozitivních vzorků.

## 2. BORDETELLA PERTUSSIS – ČERNÝ KAŠEL

**Černý kašel** je onemocnění dýchacího traktu, charakterizované obvykle hrozným kašlem, který se vyskytuje v záchvatech a trvá po několik týdnů. Hlavním původcem je *Bordetella pertussis*, GRAM-negativní tyčinka. Infekce způsobená *Bordetella parapertussis* vede pak k hýkavému kašli - stejnému onemocnění. Avšak je obvykle charakterizované mírnějšími projevy a kratší dobou onemocnění. Zatímco lidé jsou jediným rezervoárem pro *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* bývá nalézána u lidí a ovcí. Se zvýšeným výskytem na podzim a v zimě, se černý kašel se vyskytuje po celý rok. Je přenášený kapénkovou infekcí při intenzivním kontaktu. Doba inkubace onemocnění se pohybuje mezi 7 až 20 dny. Černý kašel jako onemocnění obvykle trvá od několika týdnů po několik měsíců.

Typická primo infekce je rozdělena do tří stadií:

- **katarální stadium** (1 - 2 týdny): projevuje se chřipce podobnými symptomy, jako jsou rýma, slabý kašel, celková slabost a slabá horečka
- **paroxysmální stadium** (4 - 6 týdnů): záchvaty kašle, staccatový kašel, následovaný lapáním po dechu. Záchvaty kašle se vyskytují zejména v noci. Typické hýkání je pozorováno asi u poloviny dětských případů. Horečka chybí nebo je jen mírně zvýšená teplota. Pokud je horečka přítomná, obvykle to signalizuje sekundární bakteriální infekci.
- **rekonalescentní stadium** (6 - 10 týdnů): pokles počtu záchvatů kašle

**U dospívajících a dospělých**, černý kašel může často probíhat necharakteristickým průběhem, jako prodloužený kašel bez typických záchvatů. Patogen neprodukuje doživotní imunitu. 20 a více let po infekci nebo očkování proti černému kašli, jsou lidé znovu plně vnímaví na infekci s *Bordetella pertussis*.

**U dětí** se často nevyskytuje úplně charakteristický obraz onemocnění a převládá často apnoe (zastavení dechu). Komplikace se mohou vyskytovat zvláště v prvním roce života. Nejběžnějšími komplikacemi jsou zápal plic (15 - 20 % hospitalizovaných pacientů) a středoušní zánět způsobené druhotnými infekcemi jinými mikroby. Jako velmi vzácné byly popsány neurologické komplikace jako mozkové záchvaty a hypoxické encephalopathie. Z dosud neúplně vysvětlených důvodů, neexistuje žádná či jen nepatrná pasivní imunita pro černý kašel. Následkem toho jsou novorozenci a batolata obzvláště rizikovou skupinou. Obě tyto skupiny nesou také nejvyšší riziko vážných komplikací, s někdy až fatální apnoe.

**Terapie antibiotiky** často nemá žádný významný účinek na délku a intenzitu záchvatů kašle (3), zejména pokud léčba není začatá na počátku onemocnění, tak aby se dosáhlo zřejmého klinického zlepšení. Avšak léčba může přerušit řetěz šíření infekce a chránit tak kontaktní osoby od nakažení.

**Vakcinace** je možnost pro profylaxi. STIKO (Vaccination Standing Committee), zrušil předchozí věkovou hranici (0 - 5 let) pro vakcinaci proti černému kašli k 1. lednu 2000. Nyní se doporučuje vakcinace všech dětí a dospívajících do věku 18 let. Od roku 2007 je doporučována také revakcinaci každých 10 let pro dospělé (Saxon vaccination committee).

## 3. DIAGNÓZA

V případě klasických hýkavých symptomů kašle je diagnóza často stanovená pouze z klinického nálezu. Dlouhodobý kašel bez typických záchvatů kašláním u neočkovaných dětí, dospívajících a dospělých a také u očkovaných osob je vždy indikace pro další vyšetření.

**Laboratorní diagnostika** závisí na stupni onemocnění:

- **buněčné kultury:** je možná brzo již na počátku onemocnění, pro detekci *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*. Nasofaryngeální výtěry, sekrety či materiál získaný odsáním, jsou užívány jako vzorek. Zatímco tato diagnostika je 100 % specifická, její citlivost kolísá od 5 % (dospívajících lidí a dospělých) až k 70 % (časných onemocnění neočkovaných dětí). Vyšetření metodou buněčné kultury *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* trvá několik dnů.
- **PCR: detekuje** *Bordetella pertussis* DNA a někdy také *Bordetella parapertussis* DNA. Citlivost této metody je mnohem vyšší ve srovnání s metodou buněčné kultury. Jako vzorek je používán stejný materiál jako u buněčných

kultur, nasofaryngeální výtěr, odsátý sekret. Avšak standardizace protokolu je často jen částečně úspěšné. Vyskytují se izolované případy falešně negativních i falešně pozitivních výsledků.

- **sérologie:** hodí se pro diagnózu i v dalším průběhu onemocnění. Specifické protilátky jsou zjistitelné v séru po přechodu k paroxysmálnímu stadiu. ELISA s čištěnými antigeny (PT, FHA) umožňuje odhalení IgG a IgA protilátek. Podezřelá diagnóza by měla být vždy potvrzena zvýšením titru mezi akutním a rekonvalescentním sérem (v intervalu z 2 – 4 týdnů). Standardizace u ELISA testů ještě nebylo dosaženo tak, aby bylo možné jednoznačně srovnávat mezi testovacími systémy.

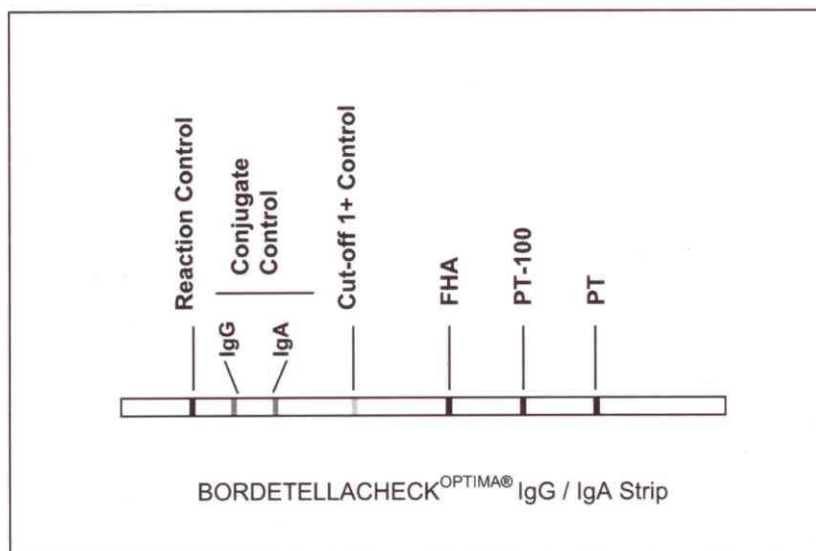
**BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA</sup>** nabízí možnost objasňující pochybných ELISA výsledků nebo potvrzovat pozitivních ELISA výsledky. Proteiny použité v tomto testu jsou imunodominantní antigeny, jejichž reakce s protilátkami umožní závěr o stadiu nákazy.

Různé imunodominantní antigeny byly použité pro **BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA</sup>**. Kromě filamentosního haemagglutininu (FHA) byl přidán na strip blotu také celkový toxin (PT) *Bordetella pertussis* (tab. 1).

**Tab. 1: Antigeny použité v BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA</sup> IgG and IgA soupravě**

Antigen	zkratka	molekulová hmotnost (kDa)
Filamentosní Hemagglutinin	FHA	35
Pertussis toxin	PT (5 podjednotek)	28 / 23 / 22 / 11,7 / 9,3

Antigeny použité v tomto testu umožňují jasnou detekci a identifikaci na IgG a IgA protilátek specifických pro *Bordetella Pertussis*. V jediném testu je získáný celkový pohled na reaktivitu protilátky proti nejdůležitějším antigenům.



#### 4. PRINCIP TESTU

Na nitrocelulóзовou membránu jsou aplikovány rekombinantní, vysoce purifikované proteiny. Membrána je po té rozstříhána na jednotlivé proužky. Při diagnostice specifických protilátek jsou proužky nejprve inkubovány se zředěným vzorkem séra. Během inkubace se protilátky váží k daným antigenům. Nenavázané složky séra jsou odstraněny promytím a proužky následně inkubovány s anti-lidskými IgG nebo IgA protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (HRP). Specificky navázané protilátky jsou detekovány pomocí HRP katalyzované barevné reakce. Došlo-li k reakci antigen-protilátka, objeví se na odpovídajícím místě proužku tmavý pruh (band).

Na horním konci testovacího proužku jsou pod sebou postupně seřazeny následující 4 kontrolní bandy:

1. kontrola reakce - umístěna těsně pod číslem proužku, tento band se musí objevit při každé reakci s jakýmkoli testovaným sérem
2. kontrolní bandy reakce konjugátu - IgG/IgA – slouží jako kontrola reakce odpovídající třídy protilátek. Pokud je proužek použit např. k detekci IgG protilátek, objeví se u kontroly IgG konjugátu zřetelný band. Totéž platí pro IgA protilátky.
3. „cut-off“ 1+ kontrola – kontrolní band intenzity zbarvení, jeho intenzita zbarvení slouží zároveň jako základní kritérium pro stanovení reaktivity séra jako Bordetella pozitivní nebo negativní.

## 5. OBSAH SOUPRAVY

Každá souprava obsahuje uvedené reagentie v množství potřebném pro 20 vyšetření:

promývací pufr A (10x koncentrovaný)	100 ml	promývací pufr A (10x koncentrovaný): obsahuje fosfátový pufr, NaCl, KCl, detergent, MIT (0.1%) a Oxyprion (0.2%) jako konzervační látky
substrát TMB	40 ml	substrát TMB (tetramethylbenzidin, přímo k použití)
mléčný prášek	2 x 2,5 g	sušený mléčný prášek
návod k použití	1 ks	návod k použití
vyhodnocovací formulář	1 ks	vyhodnocovací formulář
plastová pinzeta	1 ks	1 plastová pinzeta
inkubační miska	2 ks	2 inkubační misky, každá s 10 žlábků

5.1. BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA</sup> IgG

Mimo reagentie uvedené v bodu 5 souprava obsahuje:

Testovací stripy	2 ks	zkumavka s číslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými rekombinantními Bordetella antigeny
Anti IgG konjugát (100x koncentrovaný)	500 µl	králičí anti-lidské protilátky konjugované s HRP, obsahuje NaN <sub>3</sub> (< 0.1%), MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%)

5.2. BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA</sup> IgA

Mimo reagentie uvedené v bodu 5 souprava obsahuje:

Testovací stripy	2 ks	zkumavka s číslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými rekombinantními Bordetella antigeny
Anti IgA konjugát (100x koncentrovaný)	500 µl	králičí anti-lidské protilátky konjugované s HRP, obsahuje NaN <sub>3</sub> (< 0.1%), MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%)

## 6. DALŠÍ POTŘEBNÉ REAGENCIE A VYBAVENÍ, KTERÉ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Deionizovaná voda, odsávací zařízení s dezinfekční nádobou, mikropipety, třepačka, odměrné válce se stupnicí, váhy, kontroly (pozitivní a negativní).

## 7. INFORMACE O TESTU A REAGENCIÍCH

## 7.1. Preventivní opatření

- Pracujte v ochranných rukavicích.
- Konjugát obsahuje azid sodný, MIT (Methylisothiazolone) a Chloracetamid. Vyvarujte se proto kontaktu s kůží a sliznicemi.
- Všechny reagentie a materiály, které přišly do styku s potenciálně infekčními vzorky, musí být dezinfikovány nebo nejméně 1 hodinu autoklávovány při 121 °C.
- Inkubační misky nepoužívejte opakovaně.
- S testovacími proužky zacházejte opatrně pomocí plastové pinzety.

## 7.2. Limitace testu

- V zájmu spolehlivosti výsledků, respektujte opatření a postupujte přesně podle návodu testu.
- Při interpretaci výsledků postupujte podle instrukcí v návodu k použití.
- Jako u všech diagnostických testů je potřeba vždy konfrontovat dosažené výsledky s klinickými nálezy.

## 7.3. Skladování

- Dodržujte prosím dobu expirace soupravy
- Shodující se reagentie (dle tištěných symbolů) mohou být použity u různých imunoblotů odpovídající šarže. Dodržujte prosím dobu expirace jednotlivých komponent soupravy.
- Reagentie skladujte při teplotě 2-8 °C, **nezmrazujte**. Před provedením testu temperujte všechny komponenty soupravy minimálně 30 minut při 18-25 °C (laboratorní teplota). Samotný test i inkubační procedury probíhají při laboratorní teplotě
- Všechna kontrolní séra musí být použita pouze u čísla šarže uvedeného na obalu soupravy, nelze je zaměňovat mezi soupravami z různých výrobních šarží.
- Zkumavku obsahující testovací proužky otevírejte až těsně před použitím, aby nedocházelo ke kondenzaci vlhkosti uvnitř zkumavky. Nepoužité proužky musí být skladovány ve zkumavce při 2-8 °C. Zkumavku pevně uzavřete, proužky nesmí před provedením testu navlhnout!
- Po uplynutí doby expirace uvedené na obalu soupravy nelze zaručit kvalitu výsledků.
- Chraňte všechny komponenty soupravy před přímým slunečním světlem.

**7.4. Skladování vzorků**

- Jako vzorek lze použít krevní sérum nebo plazmu, které byly co nejdříve po odebrání separovány od koagula. Za všech okolností předcházíte mikrobiální kontaminaci vzorků.
- Nerozpustné částice je nutné ze vzorků odstranit ještě před jejich inkubací.
- Lipemická, hemolytická nebo zakalená séra způsobují ztmavnutí pozadí testu. Mohou rovněž poskytovat falešné výsledky, proto nesmí být používány.

**Upozornění!**

Nemůžete-li test provést okamžitě, mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8°C až 2 týdny. Dlouhodoběji je lze skladovat při minimální teplotě -20°C. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků není doporučováno, neboť se tím ovlivňuje kvalita výsledků.

**7.5. Kontrola kvality**

Každá šarže testů má svou vnitřní kontrolu jakosti. Je nezbytné přezkontrolovat a dodržet požadovaný objem vzorku i kontroly aby byl celý postup uznán validním.

Je doporučeno použitím **pozitivní a negativní kontroly** ověřit výsledky testu, pro každou novou šarži nebo novou dodávku. V případě použití lyofilizovaných kontrol je doporučeno rekonstituovat kontrolu den před jejím použitím v testu.

**8. PROVEDENÍ TESTU****8.1. Obecně**

- Temperujte soupravu na laboratorní teplotu nejméně 30 minut před jejím použitím
- setřepte roztoky v ampulkách dolů tak, aby nezůstala kapalina na stěnách ampulek
- dobře promíchejte konjugáty a vzorky před použitím
- dodržujte počet promývacích kroků popsanych v bodech 9.3 a 9.5. Reprodukovatelnost výsledků závisí do značné míry na shodném promývání stripů
- Test musí být proveden pouze zaškolenými a kvalifikovanými pracovníky.
- Test je vhodný i pro zpracování na automatu. Bližší informace žádejte u svého dodavatele.

**8.2. Příprava reagensů****8.2.1. Příprava pracovního ředění promývacího pufru A**

Je používán při ředění séra a konjugátu a při promývání.

Před jeho zředěním je nutné určit objem potřebný pro daný počet prováděných testů. Nejprve rozpustíte mléčný prášek v koncentrátu promývacího pufru A. Tuto směs poté doplňte deionizovanou vodou na konečný objem (ředění 1+9). Potřebné objemy jednotlivých reagensů udává tabulka 2. Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebný objem promývacího pufru dopočítat.

Pracovní ředění promývacího pufru A může být při 2-8°C skladováno 4 týdny. Pracovní ředění promývacího pufru A je mírně zakalené a bez zápachu.

**Tab. 2:** Promývací pufr A potřebný pro daný počet testovacích proužků

Použité proužky	Mléčný prášek	Koncentrovaný promývací pufr A	Deionizovaná voda	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	0.1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0.2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0.3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0.5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1.5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2.5 g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

**8.2.2. Příprava roztoku konjugátu**

Roztok konjugátu musí být připraven těsně před použitím. Pracovní ředění roztoku konjugátu není možné dále skladovat.

1 díl koncentrovaného IgG, IgA konjugátu se ředí se 100 díly pracovního ředění promývacího pufru A (1+100).

Potřebná množství jednotlivých roztoků udává tabulka 3. Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebné objemy daných roztoků dopočítat.

**Tab. 3:** Objemy pro ředění anti-lidského IgG, IgM, resp. IgA konjugátu

Použité proužky *	Koncentrovaný IgG/ IgA konjugát	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml

\* Objemy jsou počítány bez „mrtvého objemu“. Připravujte proto roztok konjugátu pro 1-3 proužky navíc v závislosti na způsobu zpracování testu (ručně nebo na automatu).

### 8.2.3. Roztok TMB substrátu

Roztok substrátu je připraven k přímému použití. Před použitím jej vytemperujte na laboratorní teplotu (18-25°C). Je nutné vyvarovat se kontaminaci roztoku substrátu, např. použitím kontaminované špičky, neboť by se tak ovlivnila citlivost testu.

### 8.3. Inkubace vzorku

#### • Ponoření stripů

1 inkubační žlábek je určen pro 1 testované sérum. Do každého žlábků napipetujte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A. Plastovou pinzetou opatrně ponořte testovací proužek do příslušného žlábků naplněného promývacím pufrům. Číslo proužku musí směřovat vzhůru.

#### **Upozornění!**

**Strip musí být celý mokrý a ponořený do promývacího pufru A**

#### • Přidání vzorků

Do příslušných žlábků napipetujte **20 µl** neředěného vzorku - lidské sérum nebo plazma (výsledné ředění **1 + 100**). Dbejte na to, abyste vzorek přidávali u konce proužku ponořeného v promývacím pufru A a co možná nejdříve opatrně promíchali. Do vyhodnocovací tabulky zaznamenejte číslo vzorku a třídu imunoglobulinů (IgG, IgM nebo IgA). Inkubační misku přikryjte víčkem a za jemného třepání při laboratorní teplotě **1 hodinu** inkubujte.

#### **Upozornění!**

**Dbejte na to, aby se roztoky nedostaly do jiných žlábků. Víčko otevírejte a zavírejte opatrně, aby jednotlivé roztoky nevystříkly ven ze žlábků (riziko křížové kontaminace).**

### 8.4. První promytí

Po uplynutí inkubační doby opatrně odstraňte plastové víčko. Zředěné sérum ze žlábků opatrně odsajte. Následně do každého žlábků přidejte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A a za jemného třepání 5 minut inkubujte. Poté pufr odsajte. Promytí opakujte ještě **tříkrát**.

#### **Upozornění!**

**Odsávejte roztoky ze žlábků vždy čistou špičkou nebo špičky vždy řádně promyjte deionizovanou vodou. Používáte-li promývačku, řiďte se pokyny výrobce.**

### 8.5 Inkubace s konjugátem

Po promytí proužků do každého žlábků přidejte **2 ml** připraveného roztoku konjugátu (viz tabulka 3). Za jemného třepání při laboratorní teplotě **45 minut** inkubujte. Během inkubace musí být žlábků zakryty plastovým víčkem.

### 8.6. Druhé promytí

Po uplynutí inkubační doby opatrně odstraňte plastové víčko. Zředěné sérum ze žlábků opatrně odsajte. Následně do každého žlábků přidejte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A a za jemného třepání 5 minut inkubujte. Poté pufr odsajte. Promytí opakujte ještě **tříkrát**.

#### **Upozornění!**

**Odsávejte roztoky ze žlábků vždy čistou špičkou nebo špičky vždy řádně promyjte deionizovanou vodou. Používáte-li promývačku, řiďte se pokyny výrobce.**

### 8.7. Reakce se substrátem

Do každého žlábků přidejte **1.5 ml roztoku substrátu** a za jemného třepání inkubujte při laboratorní teplotě **5-10 minut**. Cut-off kontrolní band musí vykazovat slabé, ale jasně zřetelné zbarvení.

### 8.8. Zastavení reakce

Po odsátí roztoku substrátu proužky třikrát promyjte deionizovanou vodou. Plastovou pinzetou proužky opatrně vyjměte, umístěte je mezi dvě vrstvy absorpčního papíru a nechte 2 hodiny sušit. Suché proužky vlepíte do vyhodnocovací tabulky a odečtené výsledky zapišete do protokolu.

Upozornění: Proužky by měly být uchovávány na temném místě.

## 9. SOUHRN PRACOVNÍHO POSTUPU

1.	Vytemperujte všechny reagenty na laboratorní teplotu
2	Vložte proužky do 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A a zkontrolujte, zda jsou v pufru zcela ponořeny.
3.	Přidejte 20 µl vzorku
4.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 1 hodinu inkubujte
5.	Na třepačce třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A
6.	Přidejte 2 ml odpovídajícího roztoku konjugátu.
7.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 45 minut inkubujte
8.	Na třepačce třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A
9.	Přidejte 1.5 ml roztoku substrátu a za jemného třepání při laboratorní teplotě inkubujte 5–10 minut
10.	Proužky promyjte nejméně třikrát deionizovanou vodou
11.	Proužky nechte mezi 2 vrstvami absorpčního papíru 2 hodiny sušit a poté odečtěte výsledky

## 10. VYHODNOCENÍ

## 10.1. Vyhodnocení intenzity bandů

- Do přiložené vyhodnocovací tabulky запиšte datum, šarži, číslo zkumavky a detekovanou podtřídou protilátek.
- Dále запиšte identifikační čísla vzorků a přilepte jednotlivé proužky na odpovídající pole vyhodnocovací tabulky tak, aby band kontroly reakce byl na vyznačené linii. Proužek poté transparentní lepicí páskou nalevo od této linie zafixujte. Pokud byste proužek přilepili lepidlem nebo lepicí páskou po celé délce, zbarvení jednotlivých bandů by vymizelo.
- Podle kontrolního proužku vytištěného na vyhodnocovacím protokolu pro každou třídu imunoglobulinů zvlášť určete u jednotlivých bandů intenzitu reakce (tabulka 4). Výsledek запиšte do protokolu.

Tab. 4: Intenzita bandů v porovnání s intenzitou zbarvení cut-off bandu

Proužky	Intenzita
Žádná reaktivita	-
intenzita slabší než u cut-off bandu	±
stejná intenzita jako u cut-off bandu	+
silná intenzita (silnější než u cut-off bandu)	++
velmi intenzivní zbarvení	+++

## 10.2. Kontrola výsledků

Výsledky testu lze hodnotit, pouze pokud jsou splněna následující kritéria:

- band kontroly reakce (nejbližší band pod číslem proužku) musí být zřetelně zbarvený
- kontrolní band třídy protilátek IgG proužek (druhý band) IgA (třetí band) musí být viditelný jasně zbarvený proužek odpovídající třídě protilátek (intenzita silnější než cut-off bandu); druhý kontrolní band protilátek může vykazovat slabé, nespecifické zbarvení
- cut-off 1+ kontrola (čtvrtý band) – slabé, ale zřetelně viditelné zbarvení

**Upozornění!**

Při detekci Bordetella IgG / IgA protilátek mohou vzorové bandy vykazovat různou intenzitu zbarvení. Intenzita jednotlivých bandů závisí na koncentraci Bordetella specifických protilátek přítomných ve vzorku, je tedy možné, že v testu BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA</sup> IgG (v porovnání s IgA testem) budou mít bandy tmavší, intenzivnější zbarvení.

## 10.3. Výsledky a interpretace testu

Pomocí výsledků stanovení IgG a IgA specifických protilátek mohou být použity ke zhodnocení imunitního stavu vůči *Bordetella pertussis*. Význam antigenů pro výklad testu je uveden v tabulce 5.

Tab. 5: Signifikance jednotlivých antigenů

Antigen	Význam
FHA	Filamentosní haemagglutinin (FHA) je důležitý pro uchycení <i>Bordetella pertussis</i> na epiteliálních buňkách hostitele. IgG protilátky proti FHA jsou vyprodukované v 80-90% infikovaných osob a IgA protilátky 50-60%. FHA se vyskytující se u <i>Bordetella pertussis</i> a <i>Bordetella parapertussis</i> , vykazuje křížovou reaktivitu s <i>Hemophilus</i> , chřipka a jiných bakterií. Protilátky proti FHA jsou vyprodukované buď po vakcinaci či po infekci s jedním z <i>Bordetella</i> druhů.

PT	<p>Pertussis toxin (PT) je toxin uvolňovaný do prostředí a sestává se z dvou součástí:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- protomer A (podjednotka S1) je enzymaticky aktivní část toxinu</li> <li>- oligomer B (podjednotky S2 - S5) jsou vazebné části toxinu</li> </ul> <p>IgG protilátky proti PT jsou produkovány 90% infikovaných, zatímco IgA protilátky jsou produkovány pouze u 40-50 %.</p> <p>Na rozdíl od FHA, který se vyskytuje i u <i>Bordetella parapertussis</i>, PT je specifický pouze pro <i>Bordetella pertussis</i> a je proto považovaný za klíčový antigen pro infekci černého kašle.</p> <p>Protilátky proti PT jsou vyprodukované buď po vakcinaci či po infekci s <i>Bordetella pertussis</i>.</p>
PT-100	<p>Pertussis toxin 100 (PT-100) byl přizpůsoben podle WHO-standardu (100 IU/ml) a podle směrnice German Robert-Koch-Institute a Německého <i>Bordetella pertussis</i> referenčního centra.</p> <p>Pozitivní PT-100 reakce je důkaz pro aktivní <i>Bordetella</i> infekci (pokud byly i typická klinická symptomy) či pro dostatečnou imunoprotekci po nedávné vakcinaci.</p>

Pro oba FHA a PT antigeny platí stejné kritéria pro IgG i IgA třídy protilátek (tab.6.)

**Tab. 6:** Interpretace reaktivity antigen-protilátka

Antigen	Intenzita zbarvení bandu	Výsledek IgG, IgA
FHA/PT/PT-100	Nižší než Cut-off 1+ band	<b>negativní</b>
FHA/PT/PT-100	Stejná nebo vyšší než Cut-off 1+ band	<b>pozitivní</b>

**Tab. 7:** Interpretace serologie černého kašle

IgG PT-100	IgG PT	IgA	Výsledek	Interpretace testu
+	+	+	<b>pozitivní</b>	přítomny IgA a IgG protilátky proti <i>Bordetella pertussis</i> <b>Akutní infekce <i>Bordetella pertussis</i> infekce</b>
-	+	+	<b>pozitivní</b>	přítomny IgA a IgG protilátky proti <i>Bordetella pertussis</i> <b>Pravděpodobná primoinfekce <i>Bordetella pertussis</i></b> IgA protilátky se vyskytují velmi zřídka po vakcinaci dop: testujte druhý vzorek za 3 týdny
+	+	-	<b>pozitivní</b>	přítomny IgG protilátky proti <i>Bordetella pertussis</i> <b>Pravděpodobnost akutní infekce černého kašle či titru po nedávné vakcinaci</b>
-	+	-	<b>pozitivní</b>	přítomny IgG protilátky proti <i>Bordetella pertussis</i> <b>Pravděpodobnost dříve prodělané infekce černého kašle či titru po dřívější vakcinaci</b>
-	-	+	<b>pozitivní</b>	přítomny IgA protilátky proti <i>Bordetella pertussis</i> <b>Pravděpodobná infekce černého kašle</b> IgA protilátky se vyskytují velmi zřídka po vakcinaci dop.: testujte nový vzorek za tři týdny
-	-	-	<b>negativní</b>	nejsou přítomny IgA a IgG protilátky proti <i>Bordetella pertussis</i> dop.: jestliže máte podezření na infekci, testujte nový vzorek za 3 týdny

Když je pozitivní pouze FHA nemůže být vyloučeno počáteční stadium infekce. Jestli klinické podezření přetrvává opakujte test s novým vzorkem za 2-3 týdny. FHA se vyskytuje u *Bordetella* druhu, nejen u *Bordetella pertussis* a je **křížově reaktivní**. Při interpretaci sérologických výsledků, je vždy nutno zahrnout do celkového závěru pacientovu historii, klinické symptomy a další laboratorní výsledky.

Software pro interpretaci výsledků.

**recomScan** software je určen pro automatické vyhodnocování a interpretaci výsledků imunoblotů vyšetření. Další informace můžete získat u dodavatele souprav.

#### 10.4. Poznámky k interpretaci výsledků testu

Výsledky IgG a IgA stanovení mohou být považovány za ohodnocení imunitního stavu pacienta vůči infekci *Bordetella pertussis*. Vzorky s pochybnými výsledky by měl být znovu testovány po 2-3 týdnech, v závislosti na klinické situaci pacienta. Do všech interpretací testů je potřeba vždy, ale

zejména v případě pochybných a pozitivních výsledků, nezbytné zahrnout klinické informace. Blízká spolupráce mezi laboratoří a ošetřujícím lékařem je tedy doporučena.

### Diagnostický význam stanovení protilátek proti *Bordetella pertussis*.

Po prvotní nákaze *Bordetella pertussis* se IgG protilátky vyskytují nejdříve za 2-3 týdny po začátku nemoci a dosahují vrcholu přibližně v 8 týdnu. IgA protilátky mohou být stanoveny už po 1-2 týdnech. Na infekci černého kašle v časném stupni, tak může ukazovat pozitivní nález pouze samostatných IgA. Zatímco IgA protilátky nejsou často zjištělné po více než 6 měsících po infekci, IgG protilátky mohou přetrvávat i několik let.

Samostatný nález pouze specifických IgG protilátek odpovídá předchozí infekci černého kašle anebo stavu po dřívější vakcinaci černého kašle. IgA nejsou po vakcinaci obvykle produkovány, stanovení specifických IgA protilátek je považované za důkaz nedávné infekce. Avšak mělo by být poznamenáno, že IgA jsou zřídka nebo pouze v nízké koncentraci, detekovatelné u dětí v prvních 6 měsících života.

Protilátky proti *Bordetella pertussis* jsou často nacházeny u nevakcinovaných dospívajících nebo dospělých. V tomto případě se jedná o opakované subklinické infekce. Diagnostická závažnost IgM protilátek je kontroverzní. Záporný výsledek nevyloučí možnost *Bordetella* infekce. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat když vzorek byl odebraný na začátku imunitní systémové reakce.

### Tmavě zbarvené testovací proužky.

Séra některých pacientů (např. s alergií na mléčné proteiny) mohou vytvářet tmavé zbarvení celého testovacího stripu. Tento efekt je vyvolán mnoha různými faktory v séru každého pacienta. Vyhodnocení proužků je pak obvykle možné pouze s určitou restrikcí. Např. „inverzní bandy“ (bílé bandy na tmavém pozadí) jsou hodnoceny jako negativní. Dané sérum však musí být v každém případě testováno znovu jinými sérologickými metodami.

## 11. KLINICKÉ VÝSLEDKY

Buněčné kultury, které jsou v diagnostice stále považovány za zlatý standard, jsou charakterizované vysokou specifitou, ale velmi nízkou citlivostí, je uváděno 12-60%, v závislosti na studii. Přímá imunofluorescence má také nízkou citlivost, popisována je mezi 11 - 68%. Zatím nejsou žádné standardizované PCR metody na odhalení *Bordetella pertussis*. Sérologická diagnostika infekce černého kašle či stanovení stavu imunizace po vakcinaci může být získáno pomocí ELISA nebo immunoblotu.

### 11.1. Vzorky z dárců krve

100 vzorků plazmy od zdravých, netříděných dárců krve bylo testováno pomocí souprav BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA®</sup> IgG a BORDETELLACHECK<sup>OPTIMA®</sup> IgA. Výsledky byly porovnány s komerčně dostupnou analytickou metodou. (tab. 9).

Tab. 9: Vzorky od dárců krve

BORDETELLACHECK <sup>OPTIMA®</sup>	PT-100 pozitivní	PT pozitivní	FHA pozitivní
IgG	3%	18 %	48 %
IgA	/	0 %	23 %

### 11.2. Srovnání stanovení ze vzorků séra a plazmy

Párové vzorky krevního séra a plazmy (EDTA-plazma) od 10 pacientů byly testované. Nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi výsledky analýzy vzorků séra a plazmy.



## 12. LITERATURA

- 1) Wirsing von König CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N, "Pertussis of adults and infants", THE LANCET Infectious Diseases, 2, 2002, 744-750
- 2) Schneeweiß B, Schmitt HJ, Wirsing von König CH, Stück B, "Neues über Pertussis und Pertussis-Impfstoffe", Deutsches Ärzteblatt 93, 49, 1996, 3270-3276
- 3) Friedman RL, "Pertussis: The Disease and New Diagnostic Methods", Clinical Microbiology Reviews, 1(4), 1988, 365-376
- 4) Meade BD, Mink CM, Manclark CR, "Serodiagnosis of Pertussis", Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892, 1994
- 5) Müller FM, Hoppe J, Wirsing von König CH, "Laboratory Diagnosis of Pertussis: State of the Art in 1997", J. Clin. Microbiology, 35, (10), 1997, 2435-2443
- 6) Wichtelhaus Thomas A, Hunfeld KP, Brade V, "Chapt. 42.13 Pertussis, In: Labor und Diagnose", (Hrsg. Thomas, L.), 6. Auflage, Frankfurt/Main, TH-Books-Verlags-Gesellschaft, 2005, 1627-1629
- 7) Rapp J, Enders G, "Diagnostische Verfahren zum Nachweis einer Pertussis-Infektion", Ärztl. Lab., 3, 1988, 181-189
- 8) Wendelboe AM, Van Rie A, "Diagnosis of pertussis: a historical review and recent developments", Expert Rev. Mol. Diagn. 6(6), 2006, 857-864
- 9) Korppi M, Hiltunen J, "Pertussis is common in Nonvaccinated Infants Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Infection", The Pediatric Infectious Disease Journal, 26(4), 2007, 316-318
- 10) Versteegh FG, Mooi-Kokenberg EA, Schellekens JF, Roord JJ, "Bordetella pertussis and mixed infections", Minerva Pediatr., 2006, 58(2), 131-137
- 11) Korppi M, Leinonen M, Mäkelä PH, Launiala K, "Mixed Infection Is Common in Children with Respiratory Adenovirus Infection", Acta Paediatr Scand, 80(4), 1991, 413-417
- 12) Cosnes-Lambe C, Raymond J, Chalumeau M, Pons-Catalano C, Moulin F, Suremain ND, Reglier-Poupet H, Lebon P, Poyart C, Gendrel D, "Pertussis and respiratory syncytial virus infections", Eur J Pediatr., November 2007, 23.
- 13) Jackson LA, Cherry JD, Wang SP, Graystone TJ, "Frequency of Serological Evidence of Bordetella Infections and Mixed Infections with other Respiratory Pathogens in University Students with Cough Illnesses", Clinical Infectious Diseases, 31,

## 13. KONTAKTY

### Výrobce:

ALL.DIAG  
10, rue Ettore Bugatti – BP6  
67038 Strasbourg Cedex 2  
tel: 03 88 78 80 88, fax: 03 88 78 76 78  
www.alldiag.com; info@alldiag.com

### Dodavatel:

LABOSERV s.r.o.  
Hudcova 532/78b, 612 00 Brno  
Tel: +420 541 243 113, Fax: +420 541 243 114  
email: laboserv@laboserv.cz  
http://www.laboserv.cz