

**VIROTECH Bordetella pertussis Toxin (PT) IgG ELISA
(B. pertussis PT IgG ELISA)**

Referencia: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

Referencia: EN215Q60

**VIROTECH Bordetella pertussis Toxin (PT) IgA ELISA
(B. pertussis PT IgA ELISA)**

Referencia: EC215A00

Código de color:

IgG: plateado / azul oscuro

IgA: plateado / negro

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

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



Índice

1. Finalidad de la prueba	3
2. Principio de la prueba	3
3. Contenido	3
3.1 Kit de ensayo IgG	3
3.2 Kit de cuantificación IgG	3
3.3 Kit de ensayo IgA.....	3
4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar	3
5. Medidas de precaución y advertencias	4
6. Material adicional necesario (no suministrado)	4
7. Realización de la prueba	4
7.1 Material de muestra	5
7.2 Preparación de los reactivos.....	5
7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH.....	5
7.4 Empleo de procesadores ELISA	5
8. Evaluación cualitativa y semicuantitativa del ensayo	6
8.1 Control del funcionamiento del ensayo:.....	6
8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE)	6
8.3 Esquema de valoración para IgG	7
8.4 Esquema de evaluación IgA.....	7
8.5 Limitaciones del ensayo.....	8
9. Evaluación cuantitativa del ensayo IgG en UI/ml	8
9.1 Control del funcionamiento del ensayo.....	8
9.2 Cálculo de los resultados cuantitativos en unidades internacionales por mililitro (UI/ml).....	8
9.3 Esquema de interpretación IgG.....	9
10. Literatura.....	9
11. Esquema de la realización de la prueba.....	11

1. Finalidad de la prueba

La prueba ELISA de toxina tosferínica detecta de forma semicuantitativa y cualitativa anticuerpos IgG u IgA en suero humano. Sirve para la determinación de una infección aguda o una infección recientemente pasada, así como para la detección de anticuerpos vacunales (control de vacunación). Con el kit de ensayo IgG es además posible realizar una cuantificación en unidades internacionales por mililitro (UI/ml) utilizando el kit de cuantificación IgG (EN215Q60) que está disponible por separado.

2. Principio de la prueba

El anticuerpo buscado en el suero humano forma un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son de nuevo eliminadas mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro.

3. Contenido

3.1 Kit de ensayo IgG

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno, liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control cut-off para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Conjugado IgG (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con estabilizadores de proteínas y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5'), 11ml**, lista para utilizar
9. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

3.2 Kit de cuantificación IgG

1. **Control de calibración IgG, 2000 µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
2. **Control débilmente reactivo IgG, 2000 µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
3. **Control fuertemente reactivo IgG, 2000 µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar

3.3 Kit de ensayo IgA

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno, liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgA, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control cut-off para IgA, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgA, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Conjugado IgA 2 (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con FCS y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5'), 11ml**, lista para utilizar
9. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. Una vez separados los pocillos individuales necesarios conserve los restantes pocillos / tiras en la bolsa cerrada con desecante a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos deben volverse a guardar a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
2. El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.
3. Extraiga únicamente la cantidad de conjugado listo para utilizar o de TMB necesaria para la prueba. El exceso de conjugado o TMB extraído no debe devolverse, sino que debe ser desechado.

Material	Estado	Almacenamiento	Durabilidad
Muestras de análisis	diluidas	de +2 hasta +8°C	máx. 6h
	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Placa de microtitulación	tras la apertura	de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante)	3 meses
Absorbente del factor reumatoide	sin diluir, tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	1 semana
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Tetrametilbencidina (TMB)	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Solución de parada	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como sueros de control sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todas las muestras, muestras diluidas, controles, conjugados y tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de parada de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Agua destilada/desionizada
2. Pipeta multicanal 50µl, 100µl
3. Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Tubos de ensayo
5. Servilletas de celulosa
6. Cubierta para placas ELISA
7. Recipientes para residuos infecciosos
8. Aparato de lavado manual para ELISA o aparato de lavado automático para placas de microtitulación
9. Espectrofotómetro para placas de microtitulación con filtro de 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)
10. Estufa de incubación

7. Realización de la prueba

El cumplimiento exacto de las instrucciones de VIROTECH Diagnostics es el requisito previo para obtener resultados correctos.

7.1 Material de muestra

Como material de análisis es posible utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el prospecto sólo se mencione el suero.

Las diluciones de pacientes siempre deben prepararse frescas.

Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse. Evítese una descongelación repetida.

1. Sólo deben utilizarse sueros recientes no inactivados.
2. No deben emplearse muestras hiperlipémicas, hemolíticas o con contaminación microbiana ni sueros que presenten turbidez (riesgo de falsos positivos o negativos).

7.2 Preparación de los reactivos

El sistema de diagnóstico de VIROTECH Diagnostics ofrece una gran flexibilidad al permitir el uso de los mismos tampones de dilución y lavado, TMB, solución de paro de citrato y conjugado para todos los parámetros y lotes. Los controles listos para utilizar son específicos para cada parámetro y deben emplearse exclusivamente con el lote de placas indicado en el certificado de control de calidad.

1. Seleccione una temperatura de 37°C en la estufa y cerciórese de que se ha alcanzado dicha temperatura antes de comenzar la incubación.
2. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
3. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.
4. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).
5. **Para una determinación correcta de IgA de toxina tosferínica es necesario tratar los sueros previamente con RF-SorboTech** (medio de adsorción de VIROTECH). En los controles IgA se suprime la preadsorción.

7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

1. Pipetee por preparación de ensayo 100µl del tampón de dilución listo para utilizar (valor en blanco), de los controles y de los sueros de paciente diluidos. Recomendamos respectivamente una preparación doble (valor en blanco, controles y sueros de paciente); para el control cut-off y de calibración es obligatoria una preparación doble. Dilución de trabajo de los sueros de paciente: 1+100; p. ej. 10µl de suero + 1ml de tampón de dilución.
2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación a 37 °C (con cubierta) durante 30 min.
3. El periodo de incubación finaliza con 4 lavados utilizando cada vez 350-400µl de solución de lavado por cavidad. No deje solución de lavado en los pocillos: retire los últimos restos de líquido sacudiendo sobre una superficie de celulosa.
4. Pipetee en todas las cavidades 100µl del conjugado listo para utilizar.
5. Incubación de los conjugados: 30 min. a 37°C (con cubierta).
6. Finalización de la incubación de los conjugados con 4 lavados (véase el punto 3).
7. Pipetee en cada pocillo 100µl de la solución de sustrato TMB lista para utilizar.
8. Incubación de la solución de sustrato: 30 minutos a 37°C (con cubierta, en la oscuridad).
9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada pocillo 50µl de la solución de parada de citrato. Agite cuidadosamente la placa hasta que los líquidos se hayan mezclado por completo y pueda verse un color amarillo uniforme.
10. Mida la absorbancia a 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm). Ajuste el fotómetro de modo que se reste el valor obtenido para el valor cero de todos los demás valores de absorbancia. La medición fotométrica debe realizarse en la hora siguiente a la adición de la solución de paro.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página
--

7.4 Empleo de procesadores ELISA

Todas las pruebas ELISA de VIROTECH Diagnostics pueden realizarse con ayuda de procesadores ELISA. El usuario está obligado a validar periódicamente el aparato.

VIROTECH Diagnostics recomienda el siguiente procedimiento:

1. Al instalar el aparato, o en caso de reparaciones importantes de su procesador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomienda validarlo según las instrucciones del fabricante.
2. Se recomienda comprobar seguidamente el procesador ELISA con el kit de validación (EC250.00). Esta comprobación periódica con el kit de validación debe realizarse al menos una vez al trimestre.

3. En cada ciclo de prueba deben cumplirse los criterios de autorización del certificado de control de calidad del producto. Este modo de procedimiento garantiza la función impecable de su procesador ELISA, sirviendo además para el aseguramiento de calidad del laboratorio.

8. Evaluación cualitativa y semicuantitativa del ensayo

Los controles listos para utilizar sirven para una determinación semicuantitativa de los anticuerpos específicos IgG e IgM, cuya concentración se indica en unidades VIROTECH (VE). Las fluctuaciones debidas a la realización de la prueba se compensan con el método de cálculo, con lo que se alcanza una elevada reproducibilidad. Para el cálculo del valor VE se emplean los valores medios de las densidades ópticas.

8.1 Control del funcionamiento del ensayo:

a) Valores de densidad óptica

El valor de densidad óptica correspondiente al valor cero debe ser inferior a 0,15.

Los valores de densidad óptica (DO) de los controles negativos deben estar por debajo de los valores de DO indicados en el certificado de control de calidad, mientras que los valores de DO de los controles positivos y del cut -off deben estar por encima de los valores de DO indicados en el certificado.

b) Unidades VIROTECH (VE)

Las unidades VIROTECH (VE) de los controles cut-off se definen como 10 VE. Los VE calculados para los controles positivos deben estar dentro de los intervalos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen estas exigencias (valores de DO, VE), debe repetirse la prueba.

8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE)

La absorbancia correspondiente al valor cero (450/620 nm) debe restarse de todos los valores de absorbancia.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{control positivo})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{control positivo})}}{\text{DO}_{(\text{control de nivel de corte})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{suero del paciente})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{suero del paciente})}}{\text{DO}_{(\text{cut - off})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Esquema de valoración para IgG

Las unidades VIROTECH (VE) del ELISA Toxina *tosferínica* IgG se han calibrado con el estándar internacional de la OMS. De ello resulta la correlación indicada en la evaluación entre las unidades VIROTECH (VE) y las unidades internacionales por mililitro (UI/ml) para IgG (7).

UI/ml (OMS)	VE	Anticuerpos IgG	Interpretación
	< 9	negativo	⇒ <i>no existe nivel elevado de anticuerpos contra toxina tosferínica</i> No hay sospecha de infección por <i>B. pertussis</i> Si existen síntomas clínicos, debe solicitarse un control de evolución o realizarse un diagnóstico diferencial
36-44	9 – 11	valor límite	⇒ <i>nivel elevado de anticuerpos contra toxina tosferínica</i> - Anticuerpos persistentes de una infección anterior - Anticuerpos de una respuesta inmunitaria incipiente - Anticuerpos vacunales
	> 11	positivo	⇒ <i>nivel significativamente elevado de anticuerpos contra toxina tosferínica</i> - Indicio de una infección reciente o pasada hace poco - Detección de anticuerpos vacunales: es imprescindible tener en cuenta el programa de vacunación, ya que la prueba no puede distinguir entre anticuerpos vacunales y anticuerpos correspondientes a una infección
≥ 100	≥ 17	infección	⇒ <i>nivel significativamente elevado de anticuerpos contra toxina tosferínica, que indica una infección aguda si la última vacunación tuvo lugar hace más de 12 meses</i>

8.4 Esquema de evaluación IgA

El ELISA Toxina *tosferínica* IgA se ha ajustado al estándar internacional de la OMS. De ello resulta la correlación indicada en la evaluación entre las unidades VIROTECH (VE) y las unidades internacionales por mililitro (IU/ml) para IgA (11, 12).

UI/ml (OMS)	VE	Anticuerpos IgA	Interpretación
< 12 UI/ml	< 9	negativo	⇒ <i>Ningún título incrementado de anticuerpos contra la toxina de pertussis:</i> Ninguna sospecha de una infección por <i>B. pertussis</i> En caso de existir síntomas clínicos, pida un control de la evolución o realice una aclaración mediante diagnóstico diferencial
	9 – 11	valor limítrofe	⇒ <i>Título incrementado de anticuerpos contra la toxina de pertussis:</i> - Anticuerpos persistentes de una infección pasada - Anticuerpos de una respuesta inmunológica incipiente - Anticuerpos a vacunas
≥ 12 UI/ml	> 11	positivo	⇒ <i>Título significativamente incrementado de anticuerpos contra la toxina de pertussis:</i> En caso de un título de anticuerpos IgG positivo adicional (> 11 VE): - Indicio de una infección actual o sufrida hace poco - Identificación de anticuerpos a vacunas: tener en cuenta imprescindiblemente la gestión de vacunas dado que el ensayo no es capaz de distinguir entre anticuerpos de vacunas y anticuerpos por una infección En caso de un título de anticuerpos IgG negativo / de valor limítrofe adicional(≤ 11 VE): - Solicitar un control de la evolución.

Observación: Los anticuerpos IgA no siempre se desarrollan, por lo que son un marcador menos fiable para la infección por *Bordetella pertussis* que los anticuerpos IgG.

1. Es imprescindible tener en cuenta el programa de vacunación, ya que la prueba no puede distinguir entre anticuerpos vacunales y anticuerpos correspondientes a una infección.
2. Si las VE calculadas para la muestra están por encima de la zona límite, la muestra se considera positiva.
3. Si las VE se encuentran dentro de la zona límite, no existe una concentración de anticuerpos significativamente alta, por lo que se considera que las muestras presentan un carácter límite. Para la determinación segura de una infección es necesario determinar el nivel de anticuerpos de dos muestras de suero: Una muestra debe tomarse inmediatamente tras el comienzo de la infección, y otra 5-10 días después (suero de convalecencia). La concentración de anticuerpos de ambas muestras debe determinarse en paralelo, es decir, en una misma prueba. No es posible un diagnóstico correcto a partir de la valoración de una única muestra de suero.
4. Si los valores medidos se encuentran por debajo de la zona límite, la muestra no contiene anticuerpos detectables específicos para el antígeno en cuestión. La muestra se considera negativa.
5. Si el resultado para IgA está en un valor límite y el resultado de IgG es inferior a 17 VE, se necesita una segunda muestra de suero para confirmar la posible existencia de una infección aguda.

8.5 Limitaciones del ensayo

La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y los otros resultados analíticos que puedan existir.

9. Evaluación cuantitativa del ensayo IgG en UI/ml

El control de calibración listo para el uso se puede adquirir de forma separada con el kit de cuantificación IgG (EN215Q60) y sirve para la determinación cuantitativa en UI/ml de los anticuerpos IgG anti-PT en el suero del paciente. El control de calibración compensa las variaciones causadas por la realización del ensayo. Para el cálculo se utilizan los valores medios de los valores OD.

9.1 Control del funcionamiento del ensayo

a) Valores OD

El valor OD del valor en blanco debe ser <0,15.

El valor OD del control de calibración debe encontrarse en el rango indicado en el certificado correspondiente.

b) UI/ml

Las concentraciones de IgG anti-PT (UI/ml) del control débilmente reactivo y del control fuertemente reactivo deben encontrarse en los rangos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen los requisitos (valores OD, UI/ml), se deberá repetir el ensayo.

9.2 Cálculo de los resultados cuantitativos en unidades internacionales por mililitro (UI/ml)

La extinción del valor en blanco (450/620nm) se debe sustraer de todas las extinciones.

La cuantificación de los sueros de los pacientes con el kit de cuantificación IgG de VIROTECH se efectúa mediante una correlación con el estándar internacional de la OMS. La curva estándar se determina en exhaustivos ensayos para cada lote de placas por medio de la regresión no lineal y se describe matemáticamente mediante la fórmula siguiente (14):

$$IU/ml = \exp(-(\ln((D-A)/((OD \text{ corr})-A)-1)-B)/C)$$

Siendo

- | | |
|----------|--|
| A: | la OD esperada con una concentración de IgG anti-PT de 0 |
| B: | el factor de pendiente |
| C: | el punto de inflexión |
| D: | la OD esperada con una concentración infinita de IgG anti-PT |
| OD corr: | la OD corregida del suero del paciente |

Para tener en cuenta las variaciones durante el procesamiento del ensayo se corrige la OD medida del suero del paciente mediante un control de calibración:

$$OD\ corr = OD\ suero\ del\ paciente * \frac{\text{Control de calibración OD valor predeterminado}}{\text{Control de calibración OD medido}}$$

Encontrará los valores de los parámetros A, B, C y D, así como el valor predeterminado para la OD del control de calibración en el certificado.

Determinación de las UI/ml

La determinación de las UI/ml se puede realizar mediante un software que podrá adquirir de VIROTECH. Como alternativa podemos proporcionarle una plantilla de evaluación para las hojas de cálculo usuales.

El rango límite para la cuantificación con el kit de cuantificación IgG de toxina tosferínica de VIROTECH se ha definido entre ≥ 40 UI/ml y < 100 IU/ml, lo que corresponde a un rango VE de ≥ 10 VE hasta < 17 VE.

El rango cuantificable se encuentra entre 5 UI/ml y 500 UI/ml.

9.3 Esquema de interpretación IgG

Las unidades internacionales (UI/ml) del ELISA Toxina tosferínica se han calibrado con el estándar internacional de la OMS. La interpretación corresponde a las recomendaciones de los centros de referencia europeos (7, 11, 12, 13, 15).

UI/ml (OMS)	Interpretación
< 40	Ningún indicio de contacto reciente con el patógeno.
≥ 40 hasta < 100	Resultado dudoso. Solicitar control de la evolución o determinación de IgA-anti-PT: - IgA-anti-PT ≤ 11 VE (corresponde a < 12 UI/ml): ningún indicio de un contacto reciente con un patógeno. - IgA-anti-PT > 11 VE (corresponde a ≥ 12 UI/ml): indicio de un contacto reciente con un patógeno, Siempre que la última vacuna haya sido aplicada hace más de 12 meses - ¡tener en cuenta la gestión de vacunas!
≥ 100	Indicio de contacto reciente con el patógeno, siempre que la última vacuna se haya administrado hace más de 12 meses - ¡Se debe tener en cuenta el programa de vacunas!

10. Literatura

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springerverlag 1991, p361 - 363
2. Wiersbitzky, Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt, 1995, Therapiewoche 25, p1485-1486
3. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Brandis, Köhler, Eggers, Pulverer, 7. Auflage, p483
4. Mastrantonio et al., *Bordetella parapertussis* infections, 1997, Dev Biol Stand, 89, p255-259
5. Mastrantonio et al., Antibody kinetics and long-term sero-prevalence in the Italian clinical trial of acellular pertussis vaccines, 1997, Dev Biol Stand, 89, p275-278
6. Wirsing von König et al., Evaluation of a single-Sample Serological Technique for Diagnosing Pertussis in Unvaccinated Children, 1999, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 18, p341-345
7. De Melker et al., Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*, 2000, J Clin Microbiol, 38, p800-806
8. Swidsinski, Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, April 1997
9. Meade et al., Serodiagnosis of Pertussis, 1994, Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.

10. Meijer, Numerical Comparison of 4 Pertussis Toxin IgG-ELISAs, 2002, nicht publiziert, Krankenhaus Groningen, NL
11. Riffelmann et al., Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis*, 2010, J Clin Microbiol, 48, p4459-4463
12. Guiso et al., What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories, 2010, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, DOI 10.1007/s10096-010-1104-y
13. RKI Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte: Pertussis (Keuchhusten), 03.09.2010
14. Plikaytis et al., Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate *Neisseria meningitidis* Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 1991, J Clin Microbiol, 29, p1439-1446
15. Podbielski et al., MiQ 13/2010, Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ), Teil II (Heft 13b), Bakterielle Erreger: *Bordetella pertussis*, 2. Auflage, p98-106

Preparación de las muestras de paciente y la solución de lavado

▼ **Solución de lavado:** Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro

Dilución del Muestras IgG
1:101

p.ej.

10 µl de suero/plasma + 1000 µl de tampón de dilución
(El tampón de dilución para suero está listo para utilizar)

Dilución del Muestras IgA
1:100

Absorción del factor reumático con RF-SorboTech

p.ej.

5 µl de suero/plasma + 450 µl de tampón de dilución
1 gota de RF-SorboTech, incubar 15 min a temp. amb.

Realización de la prueba

Incubación de muestras

30 minutos a 37°C

100 µl de muestras de paciente

valor cero (tampón de dilución) y controles

4 lavados

400 µl de solución de lavado

sacudir bien

Incubación de los conjugados

30 minutos a 37°C

100 µl de conjugado

IgG, IgA

4 lavados

400 µl de solución de lavado

sacudir bien

Incubación del sustrato

30 minutos a 37°C

100 µl de sustrato

Parada

50 µl de solución de parada

agitar con cuidado

Medición de la absorbancia

Fotómetro a 450/620nm
(longitud de onda de referencia 620-690nm)