

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

Referência: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

Referência: EN215Q60

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

Referência: EC215A00

Código de cor:

IgG: prateado/azul metálico

IgA: prateado/preto

EXCLUSIVAMENTE PARA O 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. Utilização	3
2. Princípio do teste	3
3. Conteúdo da embalagem	3
3.1 Kit de teste IgG	3
3.2 Kit de quantificação IgG	3
3.3 Kit de teste IgA.....	3
4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar	3
5. Medidas de precaução e avisos	4
6. Material necessário mas não fornecido	4
7. Realização do teste.....	4
7.1 Material de análise.....	4
7.2 Preparação dos reagentes.....	5
7.3 Realização do teste ELISA VIROTECH	5
7.4 Utilização de processadores ELISA	5
8. Avaliação qualitativa e semiquantitativa do teste	5
8.1 Controlo de função do teste:	6
8.2 Cálculo das unidades VIROTECH (VE).....	6
8.3 Esquema de avaliação IgG	6
8.4 Esquema de avaliação IgA.....	6
8.5 Limitações do teste	7
9. Avaliação quantitativa do teste IgG em IU/ml	7
9.1 Controlo funcional do teste.....	7
9.2 Cálculo dos resultados quantitativos em unidades internacionais por mililitro (IU/ml)	8
9.3 Esquema de interpretação IgG.....	8
10. Literatura.....	9
11. Esquema de realização do teste.....	10

1. Utilização

O ELISA da toxina pertussis identifica de forma semiquantitativa e qualitativa anticorpos IgG ou IgA no soro humano. Ele destina-se à comprovação de uma infecção aguda ou de uma infecção recentemente sofrida ou à detecção de anticorpos produzidos por vacinas (controlo de sucesso da vacina). Além disso, o IgG permite uma quantificação em unidades internacionais por mililitro (IU/ml), utilizando o kit de quantificação IgG que pode ser adquirido em separado (EN215Q60).

2. Princípio do teste

O anticorpo procurado no soro humano forma juntamente com o antígeno fixado na microplaca um imunocomplexo. As imunoglobulinas não ligadas são removidas por processos de lavagem. O conjugado enzimático liga-se a este complexo. Os imunoglobulinas não ligados são novamente removidos por processos de lavagem. Após a adição do substrato (TMB) é criado pela actividade enzimática (peroxidase) um corante azul que após a adição da solução de stop muda para amarelo.

3. Conteúdo da embalagem

3.1 Kit de teste IgG

1. **1 microplaca**, constituída por 96 poços individuais separáveis, revestidos com antígeno, liofilizado
2. **Tampão de diluição PBS (azul, pronto a usar), 2x50ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
3. **Solução de lavagem PBS (20x concentrada), 50 ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
4. **Controlo negativo de IgG, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
5. **Controlo cut-off de IgG, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
6. **Controlo positivo de IgG, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
7. **Conjugado IgG (anti-humano), 11 ml**, conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com estabilizadores proteicos e conservantes em tampão Tris, pronto a usar
8. **Solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), 11ml**, pronto a usar
9. **Solução stop citrato, 6ml**, contém uma mistura de ácidos

3.2 Kit de quantificação IgG

1. **Controlo de calibração IgG, 2000 µl** soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
2. **Controlo IgG fracamente reativo, 2000 µl** soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
3. **Controlo IgG fortemente reativo, 2000 µl** soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar

3.3 Kit de teste IgA

1. **1 microplaca**, constituída por 96 poços individuais separáveis, revestidos com antígeno, liofilizado
2. **Tampão de diluição PBS (azul, pronto a usar), 2x50ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
3. **Solução de lavagem PBS (20x concentrada), 50 ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
4. **Controlo negativo de IgA, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
5. **Controlo cut-off de IgA, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
6. **Controlo positivo de IgA, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
7. **Conjugado IgA 2 (anti-humano), 11 ml**, conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com FCS e conservantes em tampão Tris, pronto a usar
8. **Solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), 11ml**, pronto a usar
9. **Solução stop citrato, 6ml**, contém uma mistura de ácidos

4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar

Conservar o kit de teste a uma temperatura de 2-8°C. O prazo de validade dos vários componentes é indicado na respectiva etiqueta, o prazo de validade do kit consta no certificado de controlo de qualidade.

1. Depois de retirar os poços individuais necessários, conservar os poços/tiras restantes no saco fechado juntamente com o dissecador a uma temperatura de 2-8°C. Depois de terem sido usados conservar os reagentes de imediato novamente a 2-8°C.
2. O conjugado pronto a usar e o substrato TMB são sensíveis à luz e devem ser guardados num lugar escuro. Se devido à incidência de luz se verificar uma coloração do substrato, este deve ser inutilizado.

- Retirar apenas a quantidade de conjugado pronto a usar ou de TMB necessária para a realização do teste. Uma eventual demasia de conjugado ou TMB deve ser inutilizada, não pode ser novamente guardada.

Material	Estado	Armazenamento	Durabilidade
Amostras	Diluído	+2 a +8°C	máx. 6h
	Não diluído	+2 a +8°C	1 semana
Controlos	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Placa de microtitulação	Depois de abrir	+2 a +8° (armazenamento dentro do saco fornecido com saco contendo dissecante)	3 meses
Absorvente de factor reumatóide	Não diluído, Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Diluído	+2 a +8°C	1 semana
Conjugado	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Tetrametilbenzidina (TMB)	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Solução stop	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Solução de lavagem	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Estado diluído final (pronto a usar)	+2 a +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaução e avisos

- Como soros de controlo são usados apenas soros que foram testados e que se revelaram negativos em relação aos anticorpos de HIV1, HIV2, HIV3 e ao antigénio de superfície de hepatite B. Mesmo assim, todas as amostras, amostras diluídas, controlos, conjugados e as microtiras devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
- Os componentes que contêm conservantes bem como a solução stop de citrato e a TMB têm um efeito irritante sobre a pele, os olhos e as mucosas. Em caso de contacto lavar as áreas afectadas do corpo imediatamente com água corrente e consultar, eventualmente, um médico.
- A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.

6. Material necessário mas não fornecido

- Água destilada/desmineralizada
- Pipeta multi-canal 50µl, 100µl
- Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
- Tubos de ensaio
- Panos de celulose
- Cobertura para as placas ELISA
- Recipiente para os resíduos de material infeccioso
- Lavador manual ELISA ou lavador automático para microplacas
- Fotómetro espectral para microplacas com filtro de 450/620nm (comprimento de onda de referência 620-690nm)
- Incubadora

7. Realização do teste

O cumprimento exacto das normas de trabalho da VIROTECH Diagnostics é o pré-requisito para obter resultados corretos.

7.1 Material de análise

Como material de análise podem ser usados soro e plasma (o tipo de anticoagulantes não é relevante), mesmo se neste folheto se refere apenas o soro.

As diluições para doentes devem ser preparadas sempre frescas.

Para conservar os soros durante mais tempo, estes devem ser congelados. Evitar descongelá-los várias vezes.

- Usar apenas soros frescos não inactivados.
- Não use amostras hiperlipémicas, hemolíticas e microbianamente contaminadas nem soros turvos (resultados positivos/negativos errados).

7.2 Preparação dos reagentes

A VIROTECH Diagnostics System Diagnostik oferece uma grande flexibilidade através da possibilidade da aplicação inter-parâmetros e inter-lotes de tampões de diluição e de lavagem, TMB, solução de paragem de citrato, assim como do conjugado. Os controlos prontos a utilizar são específicos do parâmetro e devem ser utilizados exclusivamente com o lote de placas indicado no certificado de controlo de qualidade.

1. Regular a incubadora para 37°C e antes do início da incubação verificar se a temperatura é atingida.
2. Todos os reagentes devem atingir a temperatura ambiente antes de serem abertos.
3. Agitar bem todos os componentes líquidos antes da sua utilização.
4. Misturar o concentrado de solução de lavagem com água dest./desmin. até se obter 1 litro de solução (se o concentrado formar cristais, aquecer à temperatura ambiente antes de diluir e agitar bem antes de utilizar).
5. **Para a determinação correcta da toxina Pertussis IgA-I é necessário preparar os soros com RF-SorboTech** (agente adsorvente). Nos controlos de Ig-A a pré-adsorção não se aplica.

7.3 Realização do teste ELISA VIROTECH

1. Por cada teste pipetar 100µl do tampão de diluição pronto a usar (valor vazio), dos controlos e dos soros de paciente diluídos. Recomendamos usar sempre duas soluções (valor vazio, controlos e soros dos pacientes); no controlo cut-off e controlo de calibração duas soluções são absolutamente necessárias. Diluição de trabalho dos soros dos pacientes: 1+100; p.ex. 10µl de soro + 1ml de tampão de diluição.
2. Depois da pipetagem realiza-se a incubação durante 30 min. a 37°C (com cobertura).
3. Findo o período de incubação, lavar 4x os poços, cada uma com 350-400µl de solução de lavagem por poço. Não deixar a solução de lavagem dentro dos poços, removendo os últimos restos de líquido batendo sobre uma base de celulose.
4. Pipetar 100µl do conjugado pronto a usar em todos os poços.
5. Incubar os conjugados 30 min. a 37°C (com cobertura)
6. Termine a incubação do conjugado com 4 lavagens (ver Ponto 3).
7. Pipetar 100µl do substrato TMB pronto a usar em todos os poços.
8. Incubação da solução de substrato: 30 minutos a 37°C (tapar e colocar num lugar escuro).
9. Parar a reacção do substrato, pipetando 50µl de solução stop de citrato em todos os poços. Agitar a placa cuidadosamente até os líquidos estarem totalmente misturados e ser visível uma cor amarela homogênea.
10. Medir os coeficientes de extinção com 450/620nm (comprimento de onda de referência 620-690nm). Regular o fotómetro por forma a que o valor zero medido seja subtraído de todas as outros coeficientes de extinção. A medição fotométrica deve ser realizada no prazo de uma hora após a adição da solução stop.

Esquema de realização do teste ver última página

7.4 Utilização de processadores ELISA

Todas as ELISAs da VIROTECH Diagnostics podem ser executadas com a ajuda de processadores ELISA. O utilizador deve realizar uma validação regular dos aparelhos.

VIROTECH Diagnostics recomenda proceder da forma seguinte:

1. Para o ajuste do aparelho ou a realização de reparações de maior envergadura do seu processador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomenda a validação do aparelho de acordo com as indicações do fabricante do aparelho.
2. Recomenda-se verificar o processador ELISA, a seguir, com a ajuda do kit de validação (EC250.00). Esta verificação regular com o kit de validação deve ser realizada pelo menos uma vez por trimestre.
3. Sempre que se realize o teste, devem ser preenchidos os critérios de conformidade do certificado de controlo de qualidade do produto.

Este procedimento garante um funcionamento perfeito do seu processador ELISA e destina-se à garantia de qualidade do laboratório.

8. Avaliação qualitativa e semiquantitativa do teste

Os controlos prontos a usar destinam-se a uma determinação semiquantitativa de anticorpos IgG e IgM específicos cuja concentração é indicada em unidades VIROTECH (=VE). Oscilações devidas ao modo de realização do teste são compensadas pelo método de cálculo, sendo conseguida uma elevada reproduzibilidade. Para o cálculo das unidades VIROTECH são utilizados os valores médios dos valores OD.

8.1 Controlo de função do teste:

a) Valores de OD

O valor OD do valor vazio deve ser <0,15.

Os valores de OD dos controlos negativos devem situar-se abaixo dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade, enquanto os valores de OD dos controlos positivos e dos controlos cut-off devem situar-se acima dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade.

b) Unidades VIROTECH (VE)

As unidades VIROTECH (VE) dos controlos cut-off são definidas com 10 VE. As VE calculadas dos controlos positivos devem situar-se dentro das gamas indicadas no certificado de controlo de qualidade.

Se os requisitos (valores de OD, VE) não forem preenchidos, o teste deve ser repetido.

8.2 Cálculo das unidades VIROTECH (VE)

A extinção do valor zero (450/620nm) deve ser subtraída de todas os coeficientes de extinção.

$$VE_{\text{(controlo positivo)}} = \frac{OD_{\text{(controlo positivo)}}}{OD_{\text{(controlo cut - off)}} \times 10$$
$$VE_{\text{(soro de paciente)}} = \frac{OD_{\text{(soro de paciente)}}}{OD_{\text{(controlo cut - off)}} \times 10$$

8.3 Esquema de avaliação IgG

As unidades Viretoch (VE) do ensaio ELISA para detecção da toxina *Pertussis* foram calibradas segundo a norma internacional da OMS. Daí resulta a correlação indicada na avaliação, entre as unidades VIROTECH (VE) e as unidades internacionais por mililitro (IU/ml) para IgG (7).

IU/ml (OMS)	VE	Anticorpos IgG	Interpretação
	< 9	negativo	$\Rightarrow$ não existe uma titulação de anticorpos elevada contra a toxina pertussis: não há suspeita de uma infecção de <i>b. pertussis</i> Em caso de sintomática clínica pedir controlo evolutivo ou esclarecer com a ajuda de um diagnóstico diferencial
36-44	9 – 11	intermédio	$\Rightarrow$ titulação de anticorpos aumentada contra a toxina pertussis: - anticorpos persistentes de uma infecção passada - anticorpos de uma resposta imunológica no início - anticorpos produzidos por vacinas
	> 11	positivo	$\Rightarrow$ titulação de anticorpos significativamente elevada contra a toxina pertussis: - Indício para uma infecção recente ou sofrida há pouco tempo - Deteção de anticorpos produzidos por vacinas: É absolutamente necessário ter em atenção a gestão das vacinas, uma vez que o teste não é capaz de diferenciar entre anticorpos produzidos por vacinas e anticorpos produzidos pela infecção
≥ 100	≥ 17	Infecção	$\Rightarrow$ titulação de anticorpos significativamente elevada contra a toxina pertussis, o que é um indício para uma infecção aguda, caso a última vacina tenha sido dada há mais de 12 meses

8.4 Esquema de avaliação IgA

O ensaio ELISA para detecção da toxina *Pertussis* foi adaptado à norma internacional da OMS. Daí resulta a correlação indicada na avaliação, entre as unidades VIROTECH (VE) e as unidades internacionais por mililitro (IU/ml) para IgA (11, 12).

IU/ml (OMS)	VE	Anticorpos IgA	Interpretação
----------------	----	----------------	---------------

< 12 IU/ml	< 9	negativo	⇒ <i>não existe uma titulação de anticorpos elevada contra a toxina pertussis:</i> não há suspeita de uma infecção por <i>b. pertussis</i> Em caso de sintomática clínica pedir controlo evolutivo ou esclarecer com a ajuda de um diagnóstico diferencial
	9 – 11	no limite	⇒ <i>titulação de anticorpos elevada contra a toxina pertussis:</i> - anticorpos persistentes de uma infecção passada - anticorpos de uma resposta imunológica a iniciar - anticorpos produzidos por vacinas
≥ 12 IU/ml	> 11	positivo	⇒ <i>titulação de anticorpos significativamente elevada contra a toxina pertussis:</i> Em caso de titulação de anticorpos IgG adicionalmente positiva (> 11 VE): - Indício de uma infecção recente ou sofrida há pouco tempo - Deteção de anticorpos produzidos por vacinas: É absolutamente necessário ter em atenção a gestão das vacinas, uma vez que o teste não é capaz de diferenciar entre anticorpos produzidos por vacinas e anticorpos produzidos pela infecção Em caso de titulação de anticorpos IgG adicionalmente negativa/ no limite (≤ 11 VE): - Solicitar o controlo evolutivo.

Nota: Nem sempre são formados anticorpos IgA, sendo, por isso, um marcador menos fiável para uma infecção de *bordetella pertussis* que o anticorpo IgG.

- É absolutamente necessário ter em atenção a gestão das vacinas, uma vez que o teste não é capaz de diferenciar entre anticorpos produzidos por vacinas e anticorpos produzidos pela infecção.
- Se as VE medidas na amostra se situarem acima da área limite, as amostras são consideradas positivas.
- Se as VE medidas se encontrarem dentro da área limite indicada, não se verifica uma concentração de anticorpos que pudesse ser considerada significativa; as amostras são consideradas no limite. Para uma detecção segura de uma infecção é necessário determinar o teor de anticorpos de duas amostras do soro. Uma amostra do soro deve ser testada imediatamente após o início da infecção e uma segunda amostra 5-10 dias mais tarde (soro reconvalescente). A concentração de anticorpos das duas amostras deve ser determinada em paralelo, isto é, na mesma solução base. Um diagnóstico correcto baseado na avaliação de uma única amostra de soro não é possível.
- Se os valores medidos se situarem abaixo da área limite definida, não existem anticorpos específicos para o antigénio que fossem medíveis na amostra. As amostras são consideradas negativas.
- Com um resultado IgA no limite e um resultado IgG < 17 VE é necessária uma segunda amostra de soro, a fim de poder chegar à uma conclusão se se trata de uma infecção aguda.

8.5 Limitações do teste

A interpretação dos resultados sorológicos deve incluir sempre o quadro clínico, dados epidemiológicos e outros resultados analíticos eventualmente disponíveis.

9. Avaliação quantitativa do teste IgG em IU/ml

O controlo de calibração pronto a usar pode ser adquirido em separado com o kit de quantificação IgG (EN215Q60) e serve para a determinação quantitativa de anticorpos IgG anti-PT em IU/ml no soro do paciente. O controlo de calibração compensa as oscilações provocadas pela realização do teste. Para o cálculo são usados os valores médios dos valores OD.

9.1 Controlo funcional do teste

a) Valores OD

O valor OD do valor vazio deve ser <0,15.

O valor OD do controlo de calibração deve situar-se na área indicada no respectivo certificado.

b) IU/ml

As concentrações IgG anti-PT (IU/ml) do controlo fracamente reativo e do controlo fortemente reativo devem situar-se dentro das áreas indicadas no certificado de controlo.

Se os requisitos (valores OD, IU/ml) não forem preenchidos, o teste deve ser repetido.

9.2 Cálculo dos resultados quantitativos em unidades internacionais por mililitro (IU/ml)

A extinção do valor vazio (450/620nm) deve ser subtraído de todas as extinções.

A qualificação dos soros de doentes com o Conjunto de qualificação IgG VIROTECH é efectuada por meio de correlação com a norma internacional da OMS. Testes abrangentes determinam para cada lote de placas a curva padrão através da regressão não-linear, realizando-se a descrição matemática pela seguinte fórmula (14):

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

Aqui significam

- A: OD esperado numa concentração IgG anti-PT de 0
 B: Fator de subida
 C: Ponto de viragem
 D: OD esperado numa concentração IgG anti-PT infinitamente elevada
 OD corr: OD corrigido do soro do paciente

Para ter em consideração as oscilações ao longo da realização do teste, o OD medido do soro de paciente é corrigido mediante um controlo de calibração:

$$OD \text{ corr} = OD \text{ soro paciente} * \frac{OD \text{ controlo de calibração pedefinição}}{OD \text{ controlo de calibração medido}}$$

Os valores dos parâmetros A, B, C e D e também a predefinição para o OD do controlo de calibração constam no certificado.

Determinação dos IU/ml

A determinação dos IU/ml pode ser feita por um software que pode ser adquirido na VIROTECH. Como alternativa, pode ser disponibilizado um modelo de avaliação para cálculos de tabela habituais.

A área limite na quantificação com o kit de quantificação VIROTECH Pertussis Toxina IgG é definida de ≥ 40 IU/ml a < 100 IU/ml o que corresponde à área VE de ≥ 10 VE a < 17 VE.

A área quantificável situa-se entre 5 IU/ml e 500 IU/ml.

9.3 Esquema de interpretação IgG

As unidades internacionais (UI/ml) do ELISA Pertussis Toxin IgG foram calibradas com o padrão internacional da OMS. A interpretação corresponde às recomendações de centros de referência europeus (7, 11, 12, 13, 15).

IU/ml (OMS)	Interpretação
< 40	Sem indício de contato recente com o agente patogénico.
≥ 40 a < 100	Resultado duvidoso. Solicitar o controlo evolutivo ou determinação do IgA anti-PT: - IgA anti-PT ≤ 11 VE (corresponde a < 12 IU/ml): Não há indícios de um contato recente com o agente patogénico. - IgA anti-PT > 11 VE (corresponde a ≥ 12 IU/ml): Indício de contacto recente com o agente patogénico, pressupondo que a última vacina se realizou há mais de 12 meses atenção à gestão de vacinas!

≥ 100	Indício de contato recente com o agente patogénico, pressupondo que a última vacina se realizou há mais de 12 meses – atenção à gestão de vacinas!
-------	--

10. Literatura

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springer-Verlag 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

Preparação das amostras de pacientes e solução de lavagem

▼ **Solução de lavagem:** Juntar água destilada/desmineralizada ao concentrado, por forma a obter 1 litro.

Diluição amostras IgG 1:101

p.ex.:

10 µl de soro/plasma + 1000 µl de tampão de diluição
(o tampão de diluição do soro está pronto a usar)

Diluição amostras IgA 1:100

Adsorção de factores reumatóides com RF-SorboTech

p.ex.:

5 µl de soro/plasma + 450 µl de tampão de diluição +
1 gota de RF-SorboTech incubar durante 15 min. à
temperatura ambiente

Realização do teste

