

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgG LINE Immunoblot
(B. pertussis + CatACT IgG LINE-32)

N° articolo: WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

N° articolo: WE116G96

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgA LINE Immunoblot
(B. pertussis + CatACT IgA LINE-32)

N° articolo: WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

N° articolo: WE116A96

SOLO PER USO DIAGNOSTICO 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



Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test.....	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Kit per 32 determinazioni	3
3.2 Kit per 32 determinazioni	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi	4
5. Precauzioni e avvertenze.....	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito)	4
7. Materiale di analisi	5
8. Esecuzione del test	5
8.1 Materiale di analisi.....	5
8.2 Preparazione dei reattivi	5
8.3 Esecuzione del test di Immunoblot	5
8.4 Impiego di processori Immunoblot	6
9. Valutazione del test.....	6
9.1 Valutazione dei campioni	6
9.2 Impiego del controllo cut off	7
9.3 Significato degli antigeni	7
9.4 Criteri di valutazione	7
9.5 Limiti del test	8
10. Bibliografia.....	9
11. Schema di svolgimento del test.....	10

1. Finalità d'uso

Kit Line Immunoblot per l'individuazione qualitativa di anticorpi IgG e/o IgA specifici della *Bordetella pertussis* nel siero umano. Il kit serve per la diagnosi di un'infezione da *Bordetella pertussis* recente, passata da una tempo più o meno breve, o per la diagnosi differenziale di manifestazioni cliniche croniche con tosse non caratteristica. La contemporanea individuazione di anticorpi specifici diretti contro la tossina pertossica (PT) e la porzione catalitica della tossina adenilato-ciclastasi (CatACT) facilita nella maggior parte dei casi la differenziazione fra un'infezione da *Bordetella pertussis* e una vaccinazione.

Il kit Line Immunoblot può inoltre fornire un'indicazione di una possibile infezione da *B. parapertussis*. La mancanza di anticorpi specifici anti-PT e la contemporanea comparsa di anticorpi anti-CatACT [specifici del genere] (17) e anti-HA può essere interpretata come indicazione di un'infezione da *B. parapertussis*.

2. Principio del test

Le proteine di *B. pertussis* vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante uno speciale processo di nebulizzazione. Tale membrana viene in seguito tagliata in singole strisce.

L'incubazione delle strisce di nitrocellulosa che supportano l'antigene assieme ai campioni di siero/plasma umano consente di individuare la presenza di anticorpi specifici. Tali anticorpi formano immunocomplessi con l'antigene fissato sulle strisce di prova. Dopo avere rimosso gli anticorpi non legati mediante opportune fasi di lavaggio, le singole strisce di nitrocellulosa vengono incubate con anticorpi IgG e/o IgA anti-umani coniugati a fosfatasi alcalina. Mediante un'ulteriore fase di lavaggio si rimuovono poi gli anticorpi coniugati non legati e si esegue la visualizzazione del complesso antigene/anticorpi (gli anticorpi legati), aggiungendo un substrato non colorato il quale, per reazione enzimatica propria, genera bande di colore violetto ("bande dell'antigene"). La reazione enzima/substrato viene arrestata lavando le strisce di nitrocellulosa in acqua distillata/deionizzata. A seconda del pattern delle bande osservato, si può rilevare la presenza di anticorpi specifici IgG e/o IgA.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit per 32 determinazioni

1. Strisce di prova di nitrocellulosa IgG o IgA con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso	1x	32 strisce
2. Controllo cut off IgG o IgA , siero umano, prediluito	1x	1,0 ml
3. Tampone di lavaggio e di diluizione , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris	2x	50 ml
4. Coniugato IgG o IgA (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante	1x	0,7 ml
5. Substrato (BCIP/NBT), pronto per l'uso	1x	57 ml
6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati	1x	1 pz.

3.2 Kit per 32 determinazioni

1. Strisce di prova di nitrocellulosa IgG o IgA con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso	3x	32 strisce
2. Controllo cut off IgG o IgA , siero umano, prediluito	2x	1,0 ml
3. Tampone di lavaggio e di diluizione , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris	4x	50 ml
4. Coniugato IgG o IgA (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante	3x	0,7 ml
5. Substrato (BCIP/NBT), pronto per l'uso	3x	57 ml
6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati	3x	1 pz.

Su richiesta sono disponibili anche:

IgG o IgA- Controllo positivo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Per le bande positive > banda cut off si rimanda al certificato fornito a corredo.

(Art. n°: IgG: WE116P60 o IgA: WE116P40)

IgG/IgA- Controllo negativo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Il controllo negativo non presenta nessuna banda, né bande rilevanti per la valutazione > banda cut off.

(Art. n°: IgG/IgA: WE116N20)

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Non esporre i singoli reattivi a temperature eccessivamente basse o elevate.
2. Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza.
3. Non conservare i reattivi in ambiente con luce abbagliante.
4. La soluzione per substrato BCIP/ NBT è fotosensibile e va conservata al buio.
5. **Strisce di reazione in nitrocellulosa:** utilizzare immediatamente le strisce dopo averle estratte dalla scatola. Chiudere perfettamente le scatole contenenti strisce non utilizzate e conservare a 2-8°C. Per l'archiviazione dei risultati, si raccomanda di proteggere le strisce di reazione in nitrocellulosa dalla luce diretta del sole, in modo da evitare lo scolorimento delle bande.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Strisce di reazione	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (conservazione nella busta in dotazione)	3 mesi
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	circa 6 ore
Substrato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +8°C	4 settimane
	diluizione finale (pronta per l'uso)	oppure temperatura ambiente	2 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

1. Come sieri di controllo si impiegano esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV ed agli antigeni di superficie dell'epatite B. Tuttavia i sieri di controllo, i campioni, i campioni diluiti, i coniugati e le strisce di reazione in nitrocellulosa devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. Durante l'esecuzione dell'Immunoblot indossare guanti monouso e utilizzare pinzette di plastica.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.
4. Le vasche di incubazione sono state concepite dal produttore come prodotti monouso. L'uso ripetuto di tali vasche ricade sotto la responsabilità dell'utilizzatore. In caso di uso ripetuto, raccomandiamo di disinfettare le vasche di incubazione per parecchie ore utilizzando soluzione di ipoclorito di sodio all'1%, pulendo e risciacquando a fondo con acqua corrente e acqua distillata/deionizzata.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Vasca di incubazione (se necessario disponibile come art. n° WE300.08)
2. Agitatore (verticale non centrifugo)
3. Un flacone spruzzatore per bloccare la reazione
4. Pipetta o lavatore manuale
5. Micropipette da 5 µl - 1500 µl
6. Puntali pipettatori
7. Tubetti per campioni, volumi 2-20 ml
8. Pinzetta di plastica
9. Acqua distillata o deionizzata
10. Carta filtrante

7. Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

8. Esecuzione del test

Il rigoroso rispetto del metodo indicato da VIROTECH Diagnostics è la premessa indispensabile per conseguire risultati corretti.

8.1 Materiale di analisi

1. Per ogni campione prelevato dai pazienti sono necessari 15 µl di siero o di plasma.
2. Si raccomanda di eseguire il prelievo venoso in condizioni asettiche. Separare il siero quando la coagulazione è completa (non presente per il plasma). Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato a - 20°C.
3. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente i sieri.
4. I sieri inattivati al calore, lipemici, emolitici o contaminati da batteri possono dare origine a risultati falsati e se ne sconsiglia pertanto il riutilizzo.
5. Non impiegare campioni di siero torbidi (specialmente dopo scongelamento), eventualmente centrifugarli (5 min. a 1000x g), quindi utilizzare per il test il surnatante limpido.

8.2 Preparazione dei reattivi

1. Per l'adattamento alla routine di laboratorio, è possibile elaborare tutti i LINE in un unico ciclo di prova con gli stessi tempi di incubazione e componenti con una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli cut off saranno predisposti in modo specifico ai parametri e ai lotti.
2. Prima di diluire i reattivi di prova, portare i concentrati a temperatura ambiente. Utilizzare esclusivamente acqua distillata/deionizzata di alta qualità e a temperatura ambiente.
3. Mescolare accuratamente le diluizioni prima di eseguire il test.
4. Tampone di diluizione / lavaggio
Il tampone di lavaggio e di diluizione è concentrato 10 volte. Diluire il concentrato del tampone di lavaggio e di diluizione 1:10 con acqua distillata o deionizzata (concentrato 10ml/50ml/100ml + 90ml/450ml/900ml acqua dist./deionizzata) e miscelare bene.
Sia i tamponi di diluizione/di lavaggio concentrati che quelli diluiti possono a volte presentare una colorazione giallastra. Tale fenomeno non ha alcun effetto né sulla durata del tampone, né sulla funzionalità e sull'attendibilità diagnostica della serie di test.
5. Coniugato IgG e/o IgA
Diluire il coniugato 1 + 100 con tampone di diluizione/lavaggio a diluizione finale, mescolare accuratamente. Per ciascun campione di siero si richiedono 1,5 ml di soluzione d'uso di coniugato. Vedere la tabella di diluizione del coniugato (punto: "Schema del test").
6. Soluzione per substrato
La soluzione per substrato viene fornita pronta per l'uso.

8.3 Esecuzione del test di Immunoblot

Attenzione: Per l'esecuzione e la valutazione corrette degli LINE per la B. pertussis + CatACT, utilizzare anche un controllo cut off specifico del parametro e del lotto per ogni serie di test.

Al fine di formulare una diagnosi certa di Bordetella pertussis, si raccomanda di eseguire il test LINE nelle IgG e IgA.

1. Il test va eseguito a temperatura ambiente.
2. Inserire 1 striscia per ciascun campione nell'apposita scanalatura di una vasca d'incubazione pulita. Se possibile, afferrare le strisce solo dall'estremità superiore contrassegnata.
3. Dispensare su ciascuna striscia 1,5ml di **tampone di diluizione / lavaggio** pronto per l'uso e inserire nell'agitatore. Fare attenzione che le strisce di prova in nitrocellulosa siano coperte dal liquido in modo uniforme e che non si asciughino per l'intera durata di esecuzione del test.

4. Le strisce di prova rinforzate in nitrocellulosa vanno inumidite completamente entro un minuto e possono essere incubate in posizione rovesciata verso l'alto, capovolta o di lato.
5. Aggiungere su ogni striscia **15 µl di siero/plasma del paziente o 100 µl del controllo cut off / positivo / negativo**, se possibile sull'estremità superiore contrassegnata. Incubare il siero del paziente e il controllo per 30 minuti sull'agitatore. Durante la dispensazione e il successivo versamento, fare attenzione a evitare contaminazioni crociate tra i singoli campioni.
6. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare scolare con precauzione. Mentre si fa defluire il liquido, le strisce di prova in nitrocellulosa rimangono attaccate al bordo delle scanalature. Asciugare con carta assorbente il liquido residuo.
7. Lavaggio delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per 3 x 5 minuti sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Prima di procedere con l'ultima fase di lavaggio, preparare la necessaria quantità di diluizione fresca di coniugato (v. tabella).
8. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
9. Dispensare 1,5 ml della diluizione di coniugato preparata in ciascuno dei corrispondenti solchi di incubazione e incubare per 30 minuti sull'agitatore.
10. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire.
11. Lavaggio delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per 3 x 5 minuti sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Successivamente sciacquare per 1 x 1 minuti con acqua distillata/deionizzata.
12. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
13. Dispensare 1,5 ml di soluzione per substrato pronta per l'uso in ciascun solco e sviluppare sull'agitatore per 10 ± 3 minuti.
14. Arrestare lo sviluppo cromatico facendo defluire la soluzione per substrato. Successivamente sciacquare le strisce per 3 volte senza incubazione intermedia, utilizzando 1,5 ml di acqua distillata/deionizzata per ciascuna.
15. Fare scolare l'acqua distillata/deionizzata e lasciare asciugare le strisce su un carta assorbente pulita. La colorazione di fondo, osservabile sulle strisce di prova in nitrocellulosa umide, scompare completamente sulle strisce asciutte. Rispetto alle strisce di prova in nitrocellulosa tradizionali, quelle rinforzate richiedono un tempo leggermente più lungo per asciugarsi.
16. Per la valutazione, utilizzare il relativo protocollo allegato. La dicitura delle bande altamente specifiche riportata sulla scheda di protocollo facilita la valutazione dei campioni dei pazienti.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

8.4 Impiego di processori Immunoblot

Per l'elaborazione automatica dei Blot e dei LINE, sono stati convalidati i seguenti apparecchi: Apollo e Profiblot. In linea di principio, sono idonei tutti i dispositivi automatici per Blot disponibili in commercio.

9. Valutazione del test

Per una valutazione sicura, ciascuna striscia LINE è provvista di due controlli:

1. **Controllo del siero** (= serum control):
La banda di incubazione del siero compare sotto la linea di marcatura (= markline) soltanto dopo l'incubazione con il siero del paziente.
2. **Controllo coniugato** (= conjugate control):
La strip LINE è dotata di una banda di controllo del coniugato che compare dopo l'incubazione con il coniugato corrispondente.

L'esecuzione del test è valida se sulle strisce di prova in nitrocellulosa sviluppate è chiaramente riconoscibile non solo il controllo del siero ma anche il controllo del coniugato interno.

Per la posizione della banda del controllo del siero/coniugato si rimanda alla scheda di protocollo.

9.1 Valutazione dei campioni

Per la posizione e la descrizione delle bande reattive si rimanda alla scheda di protocollo.

Bande delle IgG e IgA: FHA, CatACT, PT

9.2 Impiego del controllo cut off

L'intensità delle bande PT del controllo cut off serve per la determinazione semiquantitativa di tutte le bande che compaiono:

Bande che compaiono	Valutazione delle intensità delle bande
> banda cut off (PT)	positivo (+)
= banda cut off (PT)	nei limiti del valore (+/-)
< banda cut off (PT)	negativo (-)

9.3 Significato degli antigeni

Elenco degli antigeni utilizzati di *Bordetella pertussis* purificati (PT e FHA nativa) e ricombinanti (CatACT) derivanti dal ceppo Tohamia Phase I.

Antigene/denominazione	Significato degli antigeni	Specificità degli anticorpi in LINE
PT 28kDa	La tossina pertossica (PT) è un'esotossina prodotta esclusivamente dal batterio <i>B. pertussis</i> , pertanto è altamente specifica per questo patogeno. È composta da una subunità A enzimaticamente attiva (subunit S1) e una subunità B che si lega a recettori. La componente del vaccino acellulare e gli anticorpi anti-PT nei sieri per immunizzazione passiva mostrano la massima correlazione e proteggono da una protezione da <i>B. pertussis</i> . Per la diagnosi di Bordetella nelle IgG tramite un unico siero, la PT rappresenta l'antigene con la massima sensibilità e specificità (>98%). La tossina pertossica può essere quindi considerata marcatore proteico di un'infezione da <i>B. pertussis</i> . Per quanto riguarda le IgA e IgM, la risposta anticorpore anti-PT si aggira solo intorno al 40-50% dei casi di pertosse (4, 5).	Altamente specifico per <i>B. pertussis</i>
CatACT 43kDa	La tossina adenilato-ciclastasi (ACT) è un antigene non presente nei vaccini contro la <i>B. pertussis</i> . Essa rappresenta un importante fattore di virulenza della <i>B. pertussis</i> (6). È generalmente nota la reattività crociata della proteina ACT totale con le tossine appartenenti alla famiglia RTX, inclusa l'emolisina di <i>E. coli</i> (7, 8, 9,10), alle quali manca tuttavia l'unità enzimatica dell'adenilato-ciclastasi. Per questo motivo, la <i>B. pertussis</i> + CatACT LINE utilizza solo la porzione N-terminale di 400 AA dell'antigene ACT (denominato CatACT), contenente i domini catalitici specifici per <i>Bordetella sp.</i> . Per le IgG la CatACT è il marker d'infezione migliore per la diagnostica sierologica che non viene influenzato dallo stato della vaccinazione. Al momento della diagnosi, il 68,0% dei pazienti positivi alla coltura erano sieropositivi per la CatACT nelle IgG. È stato dimostrato che, dopo la PT, la CatACT è il secondo marker più sensibile. (11) Pertanto, la determinazione contemporanea di anticorpi contro la CatACT e la PT evidenzia la presenza di un'infezione acuta o passata recentemente.	Specifico per <i>Bordetella sp.</i>
FHA 220kDa	L' emoagglutinina filamentosa (FHA) è una proteina di superficie di <i>Bordetella pertussis</i> . Riveste il ruolo di importante adesina per l'agente patogeno (4). La risposta anticorpale alla FHA è molto elevata nelle IgG con una percentuale dell'80-90% circa, mentre nelle IgA e nelle IgM è approssimativamente del 50-60% (4, 5). Nel frattempo, sulla base di numerosi studi indipendenti (3, 12, 13) è stato dimostrato che è presente una reattività crociata della FHA di <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> , oltre ad altri patogeni batterici.	Meno specifico

9.4 Criteri di valutazione

L'interpretazione dei risultati sierologici deve includere sempre il quadro clinico, i dati epidemiologici e altri dati di laboratorio a disposizione.

Valutazione delle IgG e delle IgA consigliata

PT	CatACT	Significato	Interpretazione di B. pertussis
-	- +/- +	Nessun segno di infezione da <i>Bordetella pertussis</i> . Possibile indicazione di un'infezione da <i>B. parapertussis</i> (vedere sotto)	negativo
+/-	- +/- +	La possibilità di un'infezione da <i>B. pertussis</i> molto recente o contratta già da diverso tempo non è esclusa. Si consiglia il controllo mediante un secondo siero.	nei limiti del valore
+	-	Segno di infezione da <i>Bordetella pertussis</i> recente o passata da poco. Controllare lo stato della vaccinazione	positivo
+	+/- +	Chiario segno di infezione da <i>Bordetella pertussis</i> recente o passata da poco.	

Ulteriore indicazione di un'infezione da B. parapertussis nelle IgG e IgA:

PT	CatACT	FHA	Significato	Interpretazione B. pertussis
-	+/- +	+	Possibile indicazione di un'infezione da <i>B. parapertussis</i>	negativo

Un risultato positivo per CatACT e FHA può essere interpretato, in assenza di una risposta PT, come indicazione di un'infezione da *B. parapertussis*.

Per confermare il sospetto di un'infezione da *B. parapertussis*, si consiglia di testare un secondo campione di siero 7 giorni più tardi; in questo caso deve poter essere dimostrata di nuovo l'assenza di anticorpi anti-PT. In alternativa, è possibile effettuare una PCR per *B. parapertussis*.

Banda FHA: La comparsa generale di anticorpi diretti contro l'antigene di gruppo aspecifico FHA non consente di stabilire se si tratta di un'infezione da *Bordetella pertussis* o *Bordetella parapertussis*. Potrebbe trattarsi di una reazione crociata dell'FHA con *Haemophilus influenzae* o altri patogeni oppure di anticorpi persistenti (anticorpi da vaccinazione o anticorpi di un'infezione pregressa).

In caso di dubbi relativi ai risultati sierologici della Bordetella che tengono conto dell'FHA, si può valutare anche la banda FHA del LINE (vedere *B. parapertussis*). A tale scopo la banda FHA viene valutata rispetto all'intensità della banda PT del controllo cut off:

➤ Cut off: positivo / = Cut off: al limite / = Cut off: negativo

Nota: Ggli anticorpi anti-IgA e anti-IgM non si formano sempre e quindi per un'infezione da *Bordetella pertussis* sono un marker meno affidabile rispetto agli anticorpi anti-IgG.

9.5 Limiti del test

- Un risultato negativo del Blot non esclude completamente la possibilità di un'infezione da *Bordetella pertussis*. Il campione può essere stato prelevato prima della comparsa degli anticorpi oppure gli anticorpi si trovano al di sotto del limite d'individuazione del test.
- Dalla presenza permanente o dall'assenza di anticorpi non si può desumere il successo o il fallimento di una terapia.
- Diversi studi indipendenti hanno dimostrato che esiste una reattività crociata dell'FHA di *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* e altri patogeni (3, 12, 13, 21).

4. In rari casi i sieri dei pazienti possono presentare bande "inverse" (fondo scuro, bande bianche); in tal caso non eseguire la valutazione, ossia l'Immunoblot non è valutabile. Si raccomanda di controllare il siero con altri opportuni metodi.

10. Bibliografia

1. Wirsing von König et al., 1999, Evaluation of a single-Sample Serological Technique for Diagnosing Pertussis in Unvaccinated Children, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, (18)341-345.
2. Wiersbitzky, S., Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt, Therapiewoche 25 (1995), S.1485 – 1486.
3. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259.
4. Tiller, F-W.; Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, Apr,1997.
5. Bruce D. Meade, Chrisanna M. Mink, and Charles R. Manclark. 1994. Serodiagnosis of Pertussis, Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.
6. Weingart, C. L., and A. A. Weiss. 2000. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. Infect. Immun. 68:1735–1739.
7. Arciniega, J. L., E. L. Hewlett, K. M. Edwards, and D. L. Burns. 1993. Antibodies to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in neonatal and maternal sera. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 6:325–330. Carlsson et al., Nov 1999, Acquisition of serum antibodies against filamentous hemagglutinin and pertactin unrelated to *Bordetella pertussis* infection., Clin Microbiol Infect.,(5)709-712.
8. Bauer, M. E., and R. A. Welch. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. 64:167–175.
9. Chart, H., S. M. Scotland, and B. Rowe. 1989. Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157:H7 in patients with hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 27:285–290.
10. Lee, S. J., M. C. Gray, L. Guo, P. Sebo, and E. L. Hewlett. 1999. Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Infect. Immun. 67:2090–2095.
11. Alison A. Weiss et.al, Characterization of Serological Responses to Pertussis, CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Mar.2006, p341-348.
12. Bergfors et al., Juli 1999, Parapertussis and Pertussis: Differences and Similarities in Incidence, Clinical course, and Antibody Responses, Int J Infect Dis, 3(3):140-146.
13. Carlsson et al., Nov 1999, Acquisition of serum antibodies against filamentous hemagglutinin and pertactin unrelated to *Bordetella pertussis* infection., Clin Microbiol Infect.,(5)709-712.
14. Epidemiologisches Bulletin, 1/9: 1-4, Robert Koch Institut (RKI), Populationsimmunität gegen Diphtherie und Pertussis.
15. Hallander, Microbiological and Serological Diagnosis of Pertussis, Clinical Infectious Diseases 1999;28 (Suppl.2):99-106.
16. Mastrantonio et al., 1997, Antibody kinetics and long-term sero-prevalence in the Italian clinical trial of acellular pertussis vaccines , Dev Biol Stand., (89): 275-278.
17. Watanabe, M., B. Connelly, and A. A. Weiss. 2006. Characterization of serological responses to pertussis. Clinical and vaccine immunology 13:341-8.
18. Weston, W., M. Messier, L. R. Friedland, X. Wu, and B. Howe. 2011. Persistence of antibodies 3 years after booster vaccination of adults with combined acellular pertussis, diphtheria and tetanus toxoids vaccine. Vaccine. Elsevier Ltd 29:8483-6.
19. Dragsted, D. M., B. Dohn, J. Madsen, and J. S. Jensen. 2004. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. Journal of medical microbiology 53:749-54.
20. Hallander, H. O., J. Gnarpe, H. Gnarpe, and P. Olin. 1999. *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and persistent cough in children. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 31:281-286.
21. Baughman, A. L., K. M. Bisgard, K. M. Edwards, D. Guris, M. D. Decker, K. Holland, B. D. Meade, and F. Lynn. 2004. Establishment of Diagnostic Cutoff Points for Levels of Serum Antibodies to Pertussis Toxin , Filamentous Hemagglutinin , and Fimbriae in Adolescents and Adults in the United States. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11:1045-1053.

11. Schema di svolgimento del test

Esecuzione del test in breve:

Preincubazione	30 minuti	15 µl di siero/plasma del paziente / 100 µl di controllo in 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
Lavaggio	3 x 5 minuti	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
Incubazione coniugato	30 minuti	Con 1,5 ml di diluizione d'uso (1 + 100)
Lavaggio diluizione/lavaggio	3 x 5 minuti	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
	1 x 1 minuto	Con acqua distillata/deionizzata
Incubazione substrato	10 ± 3 minuti	Con 1,5 ml per campione di soluzione per substrato
Arresto distillata/deionizzata.	3 x senza incubazione intermedia	Con 1,5 ml per campione di acqua distillata/deionizzata.

Tabella di diluizione coniugato: (valori arrotondati)

Numero strisce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampone di diluizione/lavaggio	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
coniugato Concentrato	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volumi finali	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Numero strisce	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampone di diluizione/lavaggio	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
coniugato Concentrato	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volumi finali	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Numero strisce	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampone di diluizione/lavaggio	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
coniugato Concentrato	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volumi finali	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Numero strisce	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampone di diluizione/lavaggio	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
coniugato Concentrato	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volumi finali	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml