

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

Références : WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

Références : WE116G96

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

Références : WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

Références : WE116A96

POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT

Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

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



Sommaire

1.	Usage prévu	3
2.	Principe du test.....	3
3.	Contenu	3
3.1	Kit pour 32 déterminations	3
3.2	Kit pour 96 déterminations	3
4.	Stockage et conservation du kit et des réactifs	4
5.	Mesures de précaution et mises en garde.....	4
6.	Matériel supplémentaire requis (non fourni)	4
7.	Echantillons	5
8.	Réalisation du test	5
8.1	Echantillons	5
8.2	Préparation des réactifs	5
8.3	Réalisation du test.....	5
8.4	Automatisation du test.....	6
9.	Interprétation du test	6
9.1	Interprétation des échantillons des patients.....	6
9.2	Utilisation du contrôle cut-off.....	7
9.3	Importance des antigènes	7
9.4	Critères d'interprétation	7
9.5	Limites du test	8
10.	Littérature	9
11.	Schéma du déroulement du test.....	10

1. Usage prévu

Le kit Line Immunoblot est destiné à la détection qualitative et semi-quantitative d'anticorps IgG ou IgA anti-Bordetella pertussis dans le sérum humain. Ce kit est destiné à la détection d'une infection fraîche, récente ou ancienne par Bordetella pertussis ou au diagnostic différentiel de manifestations cliniques persistantes, avec une toux non caractéristique. La détection simultanée d'anticorps spécifiques dirigés contre la toxine pertussique (PT) et le domaine catalytique de la toxine adényl cyclase (CatACT) permet dans la plupart des cas de faciliter la distinction entre une infection à *Bordetella pertussis* et une vaccination.

De plus, le Line Immunoblot peut également indiquer une infection possible à *B. parapertussis*. L'absence d'anticorps spécifiques dirigés contre la PT, associée à l'apparition d'anticorps dirigés contre CatACT [genre spécifique] (17) et la FHA, peut être considérée comme un indice d'infection à *B. parapertussis*.

2. Principe du test

Les protéines de *B. pertussis* sont déposées sur une membrane de nitrocellulose au moyen d'un procédé de pulvérisation spécial. La membrane de nitrocellulose est ensuite coupée en bandelettes individuelles.

L'incubation des bandes de nitrocellulose qui contiennent des antigènes avec des échantillons de sérum/plasma humains permet la mise en évidence d'anticorps spécifiques présents. Les éventuels anticorps présents constituent un complexe immun avec l'antigène fixé sur la bandelette. Les anticorps non liés sont éliminés par lavage. Les bandelettes sont ensuite incubées avec les conjugués anti-humains marqués à la phosphatase alcaline. L'excès est éliminé par lavage. La mise en évidence des réactions est réalisée par l'ajout d'un substrat, incolore initialement, qui permettra de visualiser les bandes antigéniques de couleur bleu-violet. La réaction enzyme/substrat est arrêtée en lavant les bandelettes à l'aide d'eau distillée/désionisée. En fonction des bandes observées, on peut conclure que l'on est en présence ou non d'anticorps IgG ou IgA spécifiques.

3. Contenu

3.1 Kit pour 32 déterminations

1. Bandelettes de test en IgG ou IgA nitrocellulose avec antigènes appliqués par pulvérisation, renforcées par un film, ordonnées dans un carnet, prêtes à l'emploi	1 x	32 bandelettes
2. Contrôle cut-off des IgG ou des IgA , sérum humain, prédilué	1 x	1,0 ml
3. Tampon de dilution/lavage , pH 7,3 (concentr. 10x), avec conservateur et Tris	2x	50 ml
4. Conjugué IgG ou IgA (concentr. 100x) conjugué phosphatase alcaline (chèvre) anti-humain, avec conservateur	1 x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), prêt à l'emploi	1 x	57 ml
6. Fiche-journal d'interprétation , pour la consignation et l'archivage des résultats.	1 x	1 unité.

3.2 Kit pour 96 déterminations

1. Bandelettes de test en IgG ou IgA nitrocellulose avec antigènes appliqués par pulvérisation, renforcées par un film, ordonnées dans un carnet, prêtes à l'emploi	3 x	32 bandelettes
2. Contrôle cut-off des IgG ou des IgA , sérum humain, prédilué	2 x	1,0 ml
3. Tampon de dilution/lavage , pH 7,3 (concentr. 10x), avec conservateur et Tris	4x	50 ml
4. Conjugué IgG ou IgA (concentr. 100x) conjugué phosphatase alcaline (chèvre) anti-humain, avec conservateur	3 x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), prêt à l'emploi	3 x	57 ml
6. Fiche-journal d'interprétation , pour la consignation et l'archivage des résultats.	3 x	1 unité.

Disponible en supplément sur demande :

IgG ou IgA- Contrôle positif, sérum humain, prédilué, 0,5 ml.

Vous trouverez les bandes positives > bandes cut-off dans le certificat joint à la livraison.

(Réf. : IgG : WE116P60 ou IgA : WE116P40)

IgG/IgA- Contrôle négatif, sérum humain, prédilué, 0,5 ml.

Le contrôle négatif ne présente pas de bandes ou tout au moins pas de bandes ≥ bandes cut-off pertinentes pour l'évaluation.

(Réf. : IgG/IgA : WE116N20)

4. Stockage et conservation du kit et des réactifs

Conserver le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle qualité.

1. Ne pas congeler les réactifs, ni les exposer à des températures élevées.
2. Ne pas utiliser les réactifs après l'expiration de la date de péremption.
3. Eviter de stocker les réactifs dans un lieu où ils sont soumis à une forte lumière.
4. Le substrat BCIP/ NBT en solution est photosensible et il doit être conservé à l'abri de toute lumière.
5. **Bandelettes de nitrocellulose** : utiliser les bandelettes immédiatement après les avoir sorties de leur sachet. Refermer hermétiquement le sachet et stocker celui-ci à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour archiver les résultats, il est impératif de tenir les bandelettes à l'abri de tout rayonnement direct du soleil afin éviter que les bandes ne se décolorent.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Bandes de test	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni)	3 mois
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	env. 6 h
Substrat	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +8° C	4 semaines
	Dilué final (prêt à l'emploi)	ou température ambiante	2 semaines

5. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les sérums de contrôle utilisés ont réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, tous les sérums de contrôle, les échantillons, les échantillons dilués, les conjugués et les bandelettes doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Lors de la réalisation des tests, porter des gants à usage unique et utiliser une pincette en plastique pour manipuler les bandelettes.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.
4. Les bacs d'incubation ont été conçus par le fabricant pour n'être utilisés qu'une seule fois. Le fabricant décline toute responsabilité s'ils sont utilisés plusieurs fois. Dans le cas d'une réutilisation éventuelle, il est recommandé de les désinfecter après utilisation en les laissant tremper plusieurs heures dans une solution d'eau de javel à 1 % (hypochlorite de sodium), de les nettoyer et de les rincer à fond à l'eau du robinet et à l'eau distillée/désionisée.

6. Matériel supplémentaire requis (non fourni)

1. Bac d'incubation (peut être commandé en fonction des besoins ; référence du produit : WE300.08)
2. Agitateur (vertical non centrifuge)
3. Une pissette d'eau déminéralisée /désionisée
4. Pipette ou dispositif de lavage des mains
5. Micropipettes de 5 µl à 1500 µl
6. Pointes de pipette
7. Tubes à échantillons de 2 à 20 ml
8. Pince en plastique
9. Eau distillée ou désionisée

7. Echantillons

Le sérum ou le plasma (en l'occurrence, le type d'anticoagulants n'est pas important) peut être utilisé comme matériel à analyser, même lorsque seul le sérum est mentionné dans la notice.

8. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est une condition essentielle à l'obtention de résultats corrects.

8.1 Echantillons

1. 15 µl de sérum ou de plasma sont nécessités par échantillon de patient.
2. Les échantillons sanguins doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse. Il faut séparer le sérum après coagulation complète (ce qui n'est pas le cas pour le plasma). Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés à -20 °C.
3. Eviter de congeler et décongeler les sérums plusieurs fois.
4. Ne pas utiliser de sérums ayant été inactivés par la chaleur, ni de sérums hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, car ils pourraient engendrer l'obtention de résultats erronés.
5. Ne pas utiliser les échantillons sériques opaques (surtout après la décongélation) ; le cas échéant, les centrifuger (5 minutes à 1 000 g), pipeter le surnageant translucide et l'utiliser pour le test.

8.2 Préparation des réactifs

1. Afin de simplifier la routine des travaux de laboratoire, les mêmes temps d'incubation et les mêmes composantes (si les temps d'incubation et les composantes sont communs aux tests) peuvent être utilisés pour tous les LINES. L'utilisation des contrôles cut-off s'effectue de façon spécifique aux paramètres et au lot.
2. Avant de diluer chacun des réactifs, amener le concentré correspondant à la température ambiante. Utiliser uniquement de l'eau distillée/désionisée de qualité élevée et à température ambiante.
3. Bien homogénéiser les dilutions d'échantillons avant de réaliser le test.
4. **Tampon de dilution et de lavage**
Diluer le tampon de dilution et de lavage concentré (10X) au 1/10 avec de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir une solution de lavage 1X (10ml/50ml/100ml de tampon concentré + 90ml/450ml/900ml d'eau dist./désionisée) et bien mélanger.
Les tampons de dilution/de lavage concentrés et dilués sont susceptibles de présenter une coloration jaune. Celle-ci n'a aucune influence ni sur la durée de conservation du tampon de dilution/de lavage, ni sur le fonctionnement et la validité diagnostique du dosage.
5. **Conjugué IgG ou IgA**
Ajouter 1 volume de conjugué phosphatase alcaline IgG ou IgM (100x) dans 100 volumes de tampon de dilution et de lavage préparé 1X. 1,5 ml de solution de conjugué sont nécessaires pour chaque échantillon de sérum. Voir le tableau de dilution du conjugué (point « Schéma de déroulement du test »).
6. **Substrat**
Le substrat est prêt à l'emploi.

8.3 Réalisation du test

Attention : Pour une réalisation et une interprétation correctes du test B. pertussis + CatACT LINE, il est impératif d'utiliser un contrôle cut-off spécifique aux paramètres et au lot pour chaque test.

**Pour obtenir un diagnostic sûr des *Bordetella pertussis*, réaliser l'LINE
pour les IgG et pour les IgA.**

1. Effectuer le test à température ambiante.

2. Pour chaque échantillon, déposer une bandelette dans la rainure d'un bac d'incubation propre. Dans la mesure du possible, saisir les bandelettes uniquement au niveau de leur extrémité portant un marquage.
3. Pour chaque bandelette, déposer 1,5 ml de **tampon de dilution et de lavage** prêt à l'emploi et placer le tout sur l'agitateur **pendant 1 minute**. Veiller à ce que les bandelettes soient recouvertes de liquide de façon homogène ; les bandelettes ne doivent pas sécher pendant toute la durée du test.
4. Les bandelettes de test en nitrocellulose renforcée sont complètement humidifiées au bout d'une minute et elles peuvent être incubées à plat sur leur face avant ou sur leur face arrière, ou bien en position latérale.
5. Dans la mesure du possible, y pipetter **15 µl de sérum/plasma du patient resp. 100 µl du contrôle cut off / positif / négatif**, au bord supérieur de la fin de la bande marqué. Incuber pendant **30 minutes** sur l'agitateur. Pendant le pipetage et lorsque l'on dépose les produits, veiller à ce qu'aucune contamination croisée des différents échantillons n'ait lieu.
6. Aspirer la totalité du liquide, avec beaucoup de précaution. Les bandelettes restent collées au fond des rainures. Egoutter le liquide restant sur un papier absorbant.
7. **Laver** les bandelettes : déposer 1,5 ml de tampon de dilution et de lavage puis incuber . Au total seront **effectués 3 lavages de 5 minutes** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou faire égoutter la totalité du tampon de dilution. Avant la fin du dernier lavage, préparer la quantité nécessaire de dilution fraîche de conjugué (voir le tableau).
8. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler (voir le point 6).
9. Sur chacune des bandelettes, déposer 1,5 ml de la dilution de conjugué et incuber le tout pendant **30 minutes** sur l'agitateur.
10. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler.
11. **Laver** les bandelettes : incuber chacune des bandelettes avec 1,5 ml de tampon de dilution et de lavage : **3 x 5 minutes au total** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou faire égoutter la totalité du tampon de dilution. Rincer ensuite **une fois pendant une minute** avec de l'eau distillée /désionisée.
12. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler (voir le point 6).
13. Déposer 1,5 ml de **substrat en solution** prêt à l'emploi dans chacune des rainures et laisser se développer la coloration sur l'agitateur pendant **10 ± 3 minutes**.
14. **Arrêter** le développement de la couleur en éliminant des rainures le substrat en solution. Laver ensuite les bandelettes **trois fois** sans incubation i. Pour chaque lavage, utiliser 1,5 ml d'eau **distillée/désionisée**.
15. Faire égoutter l'eau distillée/désionisée et faire sécher les bandelettes sur un papier absorbant propre. La coloration de l'arrière-fond que l'on peut observer lorsque les bandelettes sont humides disparaît complètement lorsque les bandelettes sont sèches.
16. Utiliser le protocole d'évaluation ci-joint pour l'interprétation des résultats. Les informations des bandes très spécifiques inscrites sur la fiche-journal facilitent l'interprétation des résultats des échantillons des patients.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page
--

8.4 Automatisation du test

Pour l'exécution automatisée des blots et des LINE, les appareils suivants sont validés : Apollo et ProfiBlot. En principe, tous les automates blot courants sont adéquats.

9. Interprétation du test

Pour garantir une interprétation sûre, chaque bandelette LINE est dotée de deux contrôles.

1. **Contrôle sérique** (= serum control) :
La bande d'incubation sérique n'apparaît en dessous de la ligne de marquage (= markline) qu'après l'incubation avec le sérum patient.
2. **Contrôle de conjugué** (= conjugate control) :
La bandelette LINE a une bande de contrôle du conjugué qui apparaît avec le conjugué correspondant après l'incubation.

Le test est valide si le contrôle sérique et le contrôle interne du conjugué sont clairement visibles sur la bandelette.

Se reporter à la fiche d'interprétation pour obtenir des informations sur la position de la bande de contrôle sérique/de conjugué.

9.1 Interprétation des échantillons des patients

Se reporter à la fiche-journal pour obtenir des informations sur la position et la désignation de la bande réactive.

Bandes IgG et IgA : FHA, CatACT, PT

9.2 Utilisation du contrôle cut-off

L'intensité de la bande PT du contrôle cut-off sert à l'évaluation semi-quantitative de toutes les bandes qui apparaissent :

Bandes	Évaluation de l'intensité des bandes
> bande cut off (PT)	positive (+)
= bande cut off (PT)	indéterminée (+/-)
< bande cut off (PT)	négative (-)

9.3 Importance des antigènes

Liste des antigènes de *Bordetella pertussis* purifiés (PT native et FHA) et recombinants (CatACT) utilisés provenant de la souche Tohama en phase I.

Dénomination de l'antigène	Importance des antigènes	Spécificité des anticorps dans le LINE
PT 28kDa	La toxine pertussique (PT) est une exotoxine synthétisée uniquement chez <i>B. pertussis</i> et par conséquent hautement spécifique de cet agent pathogène. Elle comprend une sous-unité A qui contient l'activité enzymatique (sous-unité S1) et une sous-unité B qui se lie aux récepteurs. Un composant du vaccin acellulaire et des anticorps dirigés contre la PT dans les sérums vaccinaux présentent la corrélation la plus forte avec une protection contre une infection à <i>B. pertussis</i> . Pour le diagnostic des Bordetella dans l'IgG via un sérum unique, la PT est l'antigène qui présente la sensibilité et la spécificité les plus élevées, de > 98 % chacune. La toxine pertussique peut par conséquent être considérée comme un marqueur protéique d'infection à <i>B. pertussis</i> . Dans l'IgA et l'IgM, la réponse des anticorps contre la PT est observée seulement dans 40 à 50 % des cas de Pertussis (4, 5).	Hautement spécifique de <i>B. pertussis</i>
CatACT 43kDa	La toxine adényl cyclase (ACT) est un antigène qui n'est pas présent dans les vaccins contre <i>B. pertussis</i> . Elle est un facteur de virulence essentiel de <i>B. pertussis</i> (6). La réactivité croisée de l'ensemble de la protéine ACT avec les membres de la famille des toxines RTX, y compris l'hémolysine d'E. coli (7, 8, 9,10), auxquels il manque toutefois l'unité enzymatique de l'adényl cyclase, est généralement connue. Par conséquent, le B. pertussis + CatACT LINE utilise uniquement le segment N-terminal de 400 AS de longueur de l'antigène ACT (appelé CatACT), qui contient le domaine catalytique spécifique de <i>Bordetella sp.</i> La CatACT est pour l'IgG le meilleur marqueur de l'infection dans le diagnostic sérologique qui n'est pas influencé par l'état de vaccination. Au moment du diagnostic, 68% des patients dont les cultures étaient positives étaient séropositifs à la CatACT. Il est apparu que la CtaACT était le second marqueur le plus sensible, après la PT. (11) La détection simultanée d'anticorps anti-CatACT et PT suggère donc la présence d'une infection aiguë ou récente.	Spécifique de <i>Bordetella sp.</i>
FHA 220kDa	L'hémagglutinine filamenteuse (FHA) est une protéine de surface de <i>Bordetella pertussis</i> . Elle est une adhésine importante pour le pathogène (4). La réponse des anticorps à la FHA est très élevée, en particulier dans l'IgG, avec env. 80-90%, et elle se situe aux alentours de 50-60% dans l'IgA et l'IgM. Plusieurs études indépendantes (3, 12, 13) ont démontré depuis l'existence d'une réactivité croisée de la FHA de <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> et d'autres bactéries pathogènes.	Moins spécifique

9.4 Critères d'interprétation

L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les autres résultats d'analyses disponibles.

Interprétation recommandée pour les IgG et les IgA

PT	CatACT	Importance	Interprétation B. pertussis
-	- +/- +	Pas d'indice d'infection par <i>Bordetella pertussis</i> . Indice possible d'infection à <i>B. parapertussis</i> (voir ci-dessous)	Négative
+/-	- +/- +	Une infection très précoce ou ancienne par <i>B. pertussis</i> est possible. La vérification au moyen d'un deuxième sérum est recommandée.	Indéterminée
+	-	Indice d'une infection fraîche ou récente par <i>Bordetella pertussis</i> . Vérifier le statut vaccinal	Positive
+	+/- +	Indice net d'une infection fraîche ou récente par <i>Bordetella pertussis</i> .	

Indice supplémentaire d'infection à B. parapertussis dans l'IgG et l'IgA

TP	CatACT	FHA	Signification	Interprétation B. pertussis
-	+/- +	+	Indice possible d'infection à <i>B. parapertussis</i>	Négative

Un résultat positif au CatACT et au FHA sans réponse à la PT peut être interprété comme un signe d'infection à *Bordetella parapertussis*.

Afin de confirmer la suspicion d'infection à *B. parapertussis*, nous recommandons de tester un deuxième sérum 7 jours plus tard ; aucun anticorps dirigé contre la PT ne devra être détectable. Il est également possible de réaliser une PCR pour *B. parapertussis*.

Bande FHA : L'apparition seule d'anticorps dirigés contre l'antigène de groupe non spécifique FHA ne permet pas de conclure s'il s'agit plutôt d'une infection à *Bordetella pertussis* ou à *Bordetella parapertussis*. Il pourrait s'agir soit d'une réaction croisée de la FHA avec *Haemophilus influenzae* ou d'autres agents pathogènes, soit d'anticorps persistants (anticorps présents à la suite d'une vaccination ou d'une infection passée).

En cas d'incertitudes quant aux résultats sérologiques pour *Bordetella* qui prennent en compte la FHA, il est aussi possible d'évaluer la bande FHA de LINE, voir *B. parapertussis*. Pour cela, la bande FHA est analysée par rapport à l'intensité de la bande PT du témoin cut-off :

➤ cut-off : positif / = cut-off : limite / < cut off : négatif

Remarque : Des anticorps IgA et IgM ne se forment pas toujours et ils sont de ce fait un marqueur assez peu fiable comme anticorps IgG d'une infection par *Bordetella pertussis*.

9.5 Limites du test

1. Un résultat négatif du transfert n'exclut pas complètement la possibilité d'une infection à *Bordetella pertussis*. Il est possible que l'échantillon ait été prélevé avant l'apparition des anticorps ou que le titre d'anticorps soit inférieur à la limite de détection du test.
2. La présence ou l'absence durable d'anticorps ne permet pas de conclure du succès ou de l'échec d'un traitement.
3. Au cours de plusieurs études indépendantes, l'existence d'une réactivité croisée de la FHA de *Bordetella pertussis*, de *B. parapertussis* et d'autres agents pathogènes a été démontrée (3, 12, 13, 21).
4. Dans de rares cas, les sérums des patients peuvent afficher des bandes « inversées » (fond sombres, bandes blanches) ; ne pas les interpréter : l'immunoempreinte n'est pas interprétable dans ces cas. Il faudra contrôler le sérum à l'aide d'autres méthodes sérologiques.

10. Littérature

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. Schéma du déroulement du test

Réalisation du test en bref :

Incubation des échantillons	30 minutes	15 µl de sérum/plasma du patient/100 µl de contrôle dans 1,5 ml de tampon de dilution sérique
Lavage	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de lavage et de dilution
Incubation du conjugué	30 minutes	Avec 1,5 ml de conjugué dilué (1 + 100)
Lavage	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de lavage et de dilution
	1 x 1 minute	Avec de l'eau distillée/désionisée
Incubation du substrat	10 ± 3 minutes	Avec 1,5 ml de substrat en solution
Arrêt	3 x sans incubation.	Avec 1,5 ml de l'eau distillée/désionisée

Tableau de dilution du conjugué : (valeurs arrondies)

Nbre de bandelettes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampon de dilution et de lavage	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Concentré de conjugué	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volume final	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Nbre de bandelettes	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampon de dilution et de lavage	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Concentré de conjugué	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volume final	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Nbre de bandelettes	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampon de dilution et de lavage	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Concentré de conjugué	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volume final	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Nbre de bandelettes	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampon de dilution et de lavage	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Concentré de conjugué	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volume final	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml