

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

N.º de encomenda: WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

N.º de encomenda: WE116G96

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

N.º de encomenda: WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

N.º de encomenda: WE116A96

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 para 32 determinações	3
3.2	Kit para 96 determinações	3
4.	Conservação e prazo de validade do kit e dos reagentes	4
5.	Medidas de precaução e avisos.....	4
6.	Material adicionalmente necessário (não fornecido)	4
7.	Material de análise	5
8.	Realização do teste	5
8.1	Preparação da amostra.....	5
8.2	Preparação dos reagentes	5
8.3	Execução do teste Imunoblot.....	5
8.4	Utilização de processadores automáticos.....	6
9.	Avaliação do teste.....	6
9.1	Avaliação das amostras de paciente	7
9.2	Utilização do controlo cut off.....	7
9.3	Significado dos antigénios	7
9.4	Critérios de avaliação.....	8
9.5	Limites do teste	8
10.	Literatura	9
11.	Esquema de realização do teste	10

1. Utilização

Kit de teste Line Immunoblot destinado à comprovação qualitativa de anticorpos específicos IgG ou IgA contra *Bordetella pertussis* no soro humano. O kit destina-se à detecção de infecção aguda, recente ou remota com *Bordetella pertussis*, ou para diagnóstico diferencial de manifestações clínicas de longa duração, com tosse não característica. Devido à comprovação simultânea de anticorpos específicos contra a toxina de pertussis (PT) e à parte catalítica da toxina de adenilato ciclase (CatACT), na maior parte dos casos, é possível facilitar a distinção entre uma infecção com *Bordetella pertussis* e uma vacinação.

O Line Immunoblot pode ainda oferecer um indício de uma possível infecção com *B. parapertussis*. A falta de anticorpos específicos contra a PT, com ocorrência simultânea de anticorpos contra a CatACT [género específico] (17) e a FHA, pode ser avaliada como indício de infecção com *B. parapertussis*.

2. Princípio do teste

As proteínas de *B. pertussis* transferem-se para uma membrana de nitrocelulose mediante uma técnica de pulverização. A membrana de nitrocelulose é, em seguida, cortada em tiras separadas.

A incubação das tiras de nitrocelulose que contêm o antígeno com amostras de soro/plasma humano permite comprovar a existência de anticorpos específicos. Estes anticorpos formam imunocomplexos juntamente com os antígenos fixados na tira de teste. Depois de remover os anticorpos não ligados através de vários passos de lavagem, as várias tiras de nitrocelulose são incubadas com anticorpos IgG ou IgA anti-humanos conjugados à fosfatase alcalina. Depois de remover os anticorpos conjugados não ligados através de mais um passo de lavagem, procede-se à visualização dos complexos antígeno/anticorpo (dos anticorpos ligados), através da adição de um substrato incolor que durante a sua transformação enzimática produz bandas azul/violetas ("bandas de antígeno"). A reação enzima/substrato é parada pela lavagem das tiras de nitrocelulose com água destilada/desionizada. Em função do padrão que se observa na banda, poderá concluir-se a existência ou não de anticorpos IgG ou IgA específicos.

3. Conteúdo da embalagem

3.1 Kit para 32 determinações

1. Tiras de teste de IgG ou IgA nitrocelulose com antígenos, reforçadas com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar	1x	32 tiras
2. Controlo cut off de IgG ou IgA, soro humano, pré-diluído	1x	1.0 ml
3. Tampão de diluição/lavagem, pH 7,5 (10x conc.), com tris e conservante	2x	50 ml
4. Conjugado IgG ou IgA (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante	1x	0.7 ml
5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar	1x	57 ml
6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados	1x	1 unid.

3.2 Kit para 96 determinações

1. Tiras de teste de IgG ou IgA nitrocelulose com antígenos, reforçadas com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar	3x	32 tiras
2. Controlo cut off de IgG ou IgA, soro humano, pré-diluído	2x	1.0 ml
3. Tampão de diluição/lavagem, pH 7,5 (10x conc.), com tris e conservante	4x	50 ml
4. Conjugado IgG ou IgA (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante	3x	0.7 ml
5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar	3x	57 ml
6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados	3x	1 unid.

A pedido pode ser adquirido adicionalmente:

IgG ou IgA- Controlo positivo, soro humano, pré-diluído, 0.5 ml.

As bandas positivas > bandas cut off constam do certificado fornecido.

(N.º de referência: IgG: WE116P60 ou IgA: WE116P40)

IgG/IgA- Controlo negativo, soro humano, pré-diluído, 0.5 ml.

O controlo negativo não mostra bandas, ou seja, bandas relevantes para a avaliação > bandas cut off.
(N.º de referência: IgG/IgA: WE116N20)

4. Conservação e prazo de validade do kit e dos reagentes

Guardar 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. Não congelar os vários reagentes e não expô-los a temperaturas elevadas.
2. Não usar os reagentes se o prazo de validade estiver ultrapassado.
3. Evitar guardar os reagentes num ambiente de luz forte.
4. A solução de substrato BCIP/NBT é sensível à luz e deve ser guardada num local escuro.
5. **Tiras de teste de nitrocelulose:** Usar as tiras imediatamente depois de as ter tirado do saco. Fechar bem novamente o saco com as tiras não usadas e guardá-lo a uma temperatura de 2 – 8 °C. Para arquivar os resultados, é absolutamente necessário guardar as tiras de teste de nitrocelulose protegidas da incidência directa da luz solar, a fim de evitar o desvanecimento das bandas.

Material	Estado	Armazenamento	Durabilidade
Amostras	Não diluído	+2 a +8°C	1 semana
Tiras de teste	Depois de abrir	+2 a +8°C (armazenamento dentro do saco fornecido)	3 meses
Controlos	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Conjugado	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Diluído	+2 a +8°C	Aprox. 6h
Substrato	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Solução de lavagem	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
	Estado diluído final (pronto a usar)	+2 a +8°C	4 semanas
	Estado diluído final (pronto a usar)	ou temperatura ambiente	2 semanas

5. Medidas de precaução e avisos

1. Como soros de controlo são usados apenas soros que foram testados e que se revelaram negativos em relação aos anticorpos de VIH-1, VIH-2, HCV e ao antigénio de superfície de hepatite B. Mesmo assim, os soros de controlo, as amostras, amostras diluídas, os conjugados e as tiras de teste de microcelulose devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
2. Para a realização do imunoblot devem ser usadas luvas descartáveis e uma pinça de plástico.
3. A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.
4. As tinas de incubação foram concebidas pelo fabricante para o uso único. Uma utilização repetida das tinas de incubação é da responsabilidade do utilizador. Se as tinas de incubação forem usadas várias vezes, recomendamos que depois do seu uso sejam desinfetadas durante várias horas numa solução de hipoclorito de sódio e depois lavadas e passadas exaustivamente por água proveniente da rede de abastecimento e água destilada/desionizada.

6. Material adicionalmente necessário (não fornecido)

1. Tina de incubação (se necessário pode ser adquirida com o n.º de art. WE300.08)
2. Agitador (vertical, não centrifugal)
3. Um frasco de lavagem para parar
4. Pipeta ou dispositivo de lavagem manual
5. Micropipetas 5 µl - 1500 µl
6. Pontas de pipeta

7. Tubos para amostras com 2 – 20 ml de volume
8. Pinça de plástico
9. Água destilada ou desionizada
10. Papel de filtro

7. 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.

8. Realização do teste

O cumprimento exacto das normas de trabalho da VIROTECH Diagnostics é uma condição essencial para a obtenção de resultados correctos.

8.1 Preparação da amostra

1. Por cada amostra de paciente são necessários 15 µl de soro ou plasma.
2. As amostras de sangue devem ser colhidas de forma asséptica por punção da veia. Após a coagulação completa deve ser separado o soro (não se aplica ao plasma). Para conservar os soros durante mais tempo, estes devem ser congelados a -20°C.
3. Não voltar a congelar e descongelar os soros.
4. Não devem ser usados soros inactivados pelo calor, lipémicos, hemolizados ou microbianamente contaminados porque podem originar resultados errados.
5. Não usar amostras de soro turvas (sobretudo depois da descongelação), eventualmente centrifugar (5 min. a 1.000x g), pipetar o sobrenadante límpido e usar no teste.

8.2 Preparação dos reagentes

1. Para a adaptação à rotina do laboratório, todos os LINEs podem ser usados no mesmo teste com os mesmos tempos de incubação e componentes com parâmetros e lotes abrangentes. Os controlos cut off são utilizados especificamente para os parâmetros e lotes.
2. Antes de diluir todos os reagentes do teste, o respectivo concentrado deverá ter atingido temperatura ambiente. Usar apenas água destilada/desionizada de qualidade elevada e à temperatura ambiente.
3. Antes da preparação do teste misturar bem os diluentes.
4. **Tampão de diluição/lavagem**
O tampão de diluição/lavagem existe numa concentração de 10 vezes. Diluir o concentrado de diluição/lavagem 1:10:00 com água destilada ou desionizada (10ml/50ml/100ml de concentrado + 90ml/450ml/900ml de água destilada/desionizada), misturar bem.
Tanto o tampão de diluição/lavagem concentrado como o diluído podem apresentar, eventualmente, uma coloração amarela. Esta coloração amarela não tem influência sobre o prazo de validade do tampão de diluição/lavagem nem sobre a funcionalidade ou capacidade de expressão diagnóstica do teste.
5. **Conjugado de IgG ou IgA**
Diluir o conjugado 1 + 100 com tampão de diluição/lavagem no estado diluído final e misturar bem. Por cada amostra de soro são necessários 1,5 ml de solução de conjugado. Ver tabela de diluição do conjugado (ponto: "Esquema de realização do teste").
6. **Substrato**
O substrato é fornecido pronto a usar.

8.3 Execução do teste Immunoblot

Atenção: Para a realização e avaliação correcta do LINE B. Pertussis + CatACT deverá ser realizado em cada teste também um controlo cut off específico para cada parâmetro e cada lote.

Para obter um diagnóstico seguro de Bordetella pertussis, o LINE deve ser realizado no IgG e no IgA.

1. O teste é realizado a temperatura ambiente.
2. Por cada amostra colocar 1 tira no sulco de uma tina de incubação limpa. Pegar as tiras apenas na ponta marcada superior.
3. Pipetar sempre 1,5 ml de **tampão de diluição/lavagem** pronto a usar e colocar sobre o agitador. Verificar se a tira de teste de nitrocelulose está uniformemente coberta de líquido, pois enquanto se realiza o teste as tiras não podem secar.
4. As tiras de teste de nitrocelulose reforçadas são humedecidas totalmente dentro de um minuto e podem ser incubadas deitadas de costas, de barriga ou de lado.
5. Adicionar com a pipeta sempre **15µl de soro/plasma de paciente** ou **100µl do controlo cut off / positivo / negativo**, se possível no extremo superior marcado da tira. Incubar as amostras e controlo durante **30 minutos** no agitador. Ao pipetar e durante a seguinte remoção do líquido, estar com atenção para que não haja contaminações cruzadas das várias amostras dos pacientes.
6. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitar o líquido fora com muito cuidado. Ao deitar o líquido fora as tiras de teste de nitrocelulose ficam agarradas ao fundo dos sulcos. Secar o líquido restante com um papel absorvente.
7. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. Antes de proceder ao último passo de lavagem preparar a quantidade necessária de diluente de conjugado fresco (ver tabela).
8. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6).
9. Pipetar sempre 1,5 ml do **diluente de conjugado** obtido para os respectivos sulcos de incubação e incubar durante **30 minutos** no agitador.
10. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora.
11. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. A seguir, lavar durante **1 x 1 minuto** com **água destilada/desionizada**.
12. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6).
13. Pipetar 1,5 ml da **solução de substrato** pronta a usar em cada sulco e revelar durante **10 ± 3 minutos** no agitador.
14. **Parar** a revelação da cor através da remoção do substrato. A seguir, lavar as tiras **3 x** com 1,5 ml de **água destilada/desionizada**, sem incubação intermédia.
15. Deitar a água destilada/desionizada fora e secar as tiras sobre um papel absorvente limpo. A coloração de fundo, observada em tiras de teste de nitrocelulose húmidas, desaparece totalmente quando as tiras estão secas. Em comparação com as tiras de teste de nitrocelulose habituais, as tiras de teste de nitrocelulose reforçadas levam mais tempo a secar.
16. Para a avaliação usar o registo de avaliação e a máscara específica do kit que acompanham a embalagem. A inscrição nas bandas altamente específicas na folha de registo facilita a avaliação das amostras de paciente.

Esquema de teste ver última página

8.4 Utilização de processadores automáticos

Para o processamento automatizado dos Blots e LINES estão validados os seguintes aparelhos: Apollo e Profiblot. Basicamente, são adequados todos os blots automáticos habituais.

9. Avaliação do teste

Para uma avaliação segura, cada tira de LINE proporciona dois controlos:

1. Controlo do soro (= serum control) :

A banda de incubação do soro aparece apenas depois da incubação com soro de paciente, aparecendo por baixo da linha de marcação (= markline).

2. Controlo do conjugado (= conjugate control):

A tira LINE está equipada com uma banda de controlo do conjugado que se torna visível depois da incubação com o respectivo conjugado.

O teste é válido se na tira de teste de nitrocelulose revelada estiver bem visível tanto o controlo de soro como também o controlo de conjugado interno.

A posição das bandas de soro e das bandas de controlo do conjugado consta na folha de registo.

9.1 Avaliação das amostras de paciente

A posição e a designação das bandas reactivas constam na folha de registo.

Bandas IgG e IgA: FHA, CatACT, PT

9.2 Utilização do controlo cut off

A intensidade das bandas PT do controlo cut off destina-se à avaliação semi-quantitativa de todas as bandas que ocorrem:

Bandas que ocorrem	Avaliação das intensidades de bandas
> Band cut off (PT)	positivo (+)
= Banda cut off (PT)	duvidoso (+/-)
< Banda cut off (PT)	negativo (-)

9.3 Significado dos antígenos

Relação dos antígenos *Bordetella pertussis* utilizados, limpos (PT nativa e FHA) e recombinantes (CatACT), isolados da estirpe: Tohama, Fase I.

Antígeno / Designação	Significado dos antígenos	Especificidade dos anticorpos em LINE
PT 28kDa	A toxina pertussis (PT) é uma exotoxina que só ocorre na <i>B. pertussis</i> , pelo que é altamente específica para este agente patológico. É composta por uma subunidade A enzimaticamente activa (Subunit S1) e por uma subunidade B que adere aos receptores. O componente da vacina acelular e os anticorpos contra PT contidos em soros de vacina revelam a mais alta correlação com uma protecção contra uma infecção com <i>B. pertussis</i> . Para o diagnóstico de <i>Bordetella</i> em IgG mediante um soro individual, o PT representa o antígeno com a mais elevada sensibilidade e especificidade de >98% cada. A toxina pertussis pode ser, portanto, designada como proteína marcadora de uma infecção com <i>B. pertussis</i> . No caso de IgA e IgM, uma reacção de anticorpo contra PT só ocorre em apenas 40-50% dos casos de infecção com <i>B. pertussis</i> (4, 5).	Altamente específico para <i>B. pertussis</i>
CatACT 43kDa	A toxina de adenilato ciclase (ACT) é um antígeno que não ocorre nas vacinas contra <i>B. pertussis</i> . É um factor essencial de virulência da <i>B. pertussis</i> (6). A reactividade cruzada entre a proteína ACT total e membros da família de toxina RTX – incluindo a hemolisina de <i>E.coli</i> (7, 8, 9,10) –, a que, no entanto, falta a unidade enzimática de adenilato ciclase, é de conhecimento geral. Por isso, o <i>B. pertussis</i> + CatACT LINE só utiliza a parte N-terminal 400 AS do antígeno ACT (designado por CatACT), que inclui o domínio catalítico específico para <i>Bordetella sp.</i> A CatACT é o melhor marcador de infecção para diagnóstico serológico de IgG, o qual não é influenciado pelo estado de vacinação. No momento do diagnóstico, 68,0% dos doentes com cultura positiva foram soropositivos no IgG para CatACT. Verificou-se que CatACT é o segundo marcador mais sensível a seguir a PT. (11) Por isso, a comprovação simultânea de anticorpos contra CatACT e PT indica a presença de uma infecção aguda ou recentemente sofrida.	Específico para <i>Bordetella sp.</i>
FHA 220kDa	A hemaglutinina filamentosa (FHA) é uma proteína de superfície da <i>Bordetella pertussis</i> . Serve de adesina importante para o agente patogénico (4). A resposta de anticorpo à FHA é, sobretudo em relação ao IgG, muito elevada, situando-se em cerca de 80-90%; no IgA e IgM, esta corresponde a cerca de 50-60% (4, 5). Entretanto, vários estudos independentes (3, 12, 13) mostraram que existe reactividade cruzada da FHA com <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> e outros agentes bacterianos.	Menos específico

9.4 Critérios de avaliação

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

Avaliação recomendada de IgG e IgA

PT	CatACT	Significado	Interpretação de <i>B. pertussis</i>
-	- +/- +	Sem indícios de infecção com <i>Bordetella pertussis</i> . Possível indício de uma infecção com <i>B. parapertussis</i> (ver abaixo)	negativo
+/-	- +/- +	Possibilidade de infecção muito remota ou remota com <i>B. pertussis</i> . Recomenda-se verificação com um segundo soro.	duvidoso
+	-	Indício de infecção aguda ou recente com <i>Bordetella pertussis</i> . Verificar estado de vacinação	positivo
+	+/- +	Indício evidente de infecção aguda ou recente com <i>Bordetella pertussis</i> .	

Indício

adicional de uma infecção com *B. parapertussis* no IgG ed IgA:

PT	CatACT	FHA	Significado	Interpretação de <i>B. pertussis</i>
-	+/- +	+	possível indício de infecção com <i>B. parapertussis</i>	negativo

Se faltar a resposta PT, um resultado CatACT e FHA positivo pode ser interpretado como indício de infecção de *B. parapertussis*.

Para confirmar a suspeita de infecção com *B. parapertussis*, recomenda-se testar um segundo soro após 7 dias; neste teste, não se devem detectar igualmente quaisquer anticorpos contra a PT. Em alternativa, pode realizar-se um PCR para *B. parapertussis*.

Banda FHA: A ocorrência exclusiva de anticorpos contra o antígeno de grupo não específico da FHA não permite qualquer afirmação a respeito da presença de infecção com *Bordetella pertussis* ou *Bordetella parapertussis*. Pode tratar-se, também, de reacção cruzada da FHA a *Haemophilus influenzae* ou de anticorpos persistentes (anticorpos de vacina ou anticorpos de infecção remota).

Em caso de questões sobre resultados serológicos relativos a *Bordetella* que tomem em consideração a FHA, também é possível analisar a banda FHA do LINE, ver *B. parapertussis*. Para o efeito, deve avaliar-se a banda FHA através da intensidade da banda PT do controlo cut off:

➤ Cut off: positivo / = Cut off: duvidoso / < Cut off: negativo

Nota: Os anticorpos IgA e IgM, uma vez que nem sempre são produzidos, são marcadores menos fiáveis que os anticorpos IgG para detecção de infecções com *Bordetella pertussis*.

9.5 Limites do teste

- Um resultado negativo do blot não exclui totalmente a possibilidade de uma infecção por *Bordetella pertussis*. A amostra pode ter sido recolhida antes do surgimento dos anticorpos, ou a titulação de anticorpos situa-se abaixo do limite comprovativo do teste.
- A existência duradoura ou a falta de anticorpos não permitem concluir pelo sucesso ou insucesso de uma terapia.
- Vários estudos independentes mostraram que existe reactividade cruzada da FHA com *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e outros agentes bacterianos (3, 12, 13, 21).

4. Em casos isolados, os soros de paciente podem mostrar bandas "inversas" (fundo escuro, bandas brancas); estas não devem ser consideradas, o que significa que, neste caso, o Immunoblot não pode ser utilizado. O soro deve ser analisado por outros métodos serológicos.

10. Literatura

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. Esquema de realização do teste

Realização do teste numa forma sucinta:

Incubação de amostras	30 minutos	15 µl de soro/plasma de paciente /100 µl de controlo cada um em 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem
Lavar	3 x 5 minutos	Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem
Incubação do conjugado	30 minutos	Com 1,5 ml de conjugado diluído (1 + 100)
Lavar	3 x 5 minutos 1 x 1 minuto	Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem Com água destilada/desionizada
Incubação do substrato	10 ± 3 minutos	Com 1,5 ml de substrato
Parar	3 x sem incubação intermédia	Com 1,5 ml de água destilada/desionizada

Tabela de diluição do conjugado: (arredondado)

Número de tiras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampão de diluição/lavagem	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Concentrado de conjugado	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

Número de tiras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampão de diluição/lavagem	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Concentrado de conjugado	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

Número de tiras	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampão de diluição/lavagem	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Concentrado de conjugado	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

Número de tiras	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampão de diluição/lavagem	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Concentrado de conjugado	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