

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

N° articolo: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

N° articolo: EN215Q60

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

N° articolo: EC215A00

Codice colore:

IgG: argento/blu scuro

IgA: argento/nero

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Kit per test IgG.....	3
3.2 Set di quantificazione IgG	3
3.3 Kit per test IgA	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso.....	3
5. Precauzioni e avvertenze	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito).....	4
7. Esecuzione del test.....	4
7.1 Materiale di analisi	4
7.2 Preparazione dei reattivi	5
7.3 Esecuzione del test VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Impiego di strumenti ELISA.....	5
8. Valutazione del test qualitativa e semiquantitativa	6
8.1 Controlli funzionali del test	6
8.2 Calcolo delle unità VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schema di valutazione delle IgG.....	6
8.4 Schema di valutazione delle IgA	6
8.5 Limiti del test.....	7
9. Valutazione quantitativa del test delle IgG in IU/ml.....	7
9.1 Controlli funzionali del test	7
9.2 Calcolo dei risultati quantitativi in Unità Internazionali al millilitro (UI/ml)	8
9.3 Schema di interpretazione IgG.....	8
10. Bibliografia	9
11. Schema di svolgimento del test	10

1. Finalità d'uso

Il test ELISA anti-tossina pertussica serve all'individuazione semiquantitativa e qualitativa degli anticorpi IgG o IgA nel siero umano.

Serve all'individuazione di un'infezione acuta o un'infezione superata di recente, nonché al rilevamento di anticorpi da vaccinazione (controllo dell'esito della vaccinazione). Nella IgG è ora inoltre possibile eseguire una quantificazione in unità internazionali al millilitro (IU/ml), utilizzando il set di quantificazione per IgG disponibile separatamente (EN215Q60).

2. Principio del test

L'anticorpo ricercato nel siero umano forma un complesso immunitario con l'antigene fissato sulla micropiastra. Le immunoglobuline non legate sono rimosse mediante processi di lavaggio. Il coniugato enzimatico si lega a questo complesso. Il coniugato non legato è rimosso anch'esso a sua volta mediante processi di lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione di substrato (TMB), l'attività enzimatica (perossidasi) causa la comparsa di una colorazione blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit per test IgG

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti singoli in strip rompibili, rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **soluzione PBS per lavaggio (concentrata 20 volte), 50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
4. **controllo IgG negativo, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
5. **controllo IgG cut-off, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
6. **controllo IgG positivo, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
7. **coniugato IgG (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con stabilizzante proteico e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
8. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 11ml**, pronta per l'uso
9. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

3.2 Set di quantificazione IgG

1. **Controllo della calibrazione per IgG, 2000 µl**, siero umano con stabilizzatori proteici e conservante, pronto per l'uso
2. **Controllo debolmente reattivo per IgG, 2000 µl**, siero umano con stabilizzatori proteici e conservante, pronto per l'uso
3. **Controllo fortemente reattivo per IgG, 2000 µl**, siero umano con stabilizzatori proteici e conservante, pronto per l'uso

3.3 Kit per test IgA

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti singoli in strip rompibili, rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **soluzione PBS per lavaggio (concentrata 20 volte), 50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
4. **controllo IgA negativo, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
5. **controllo IgA cut-off, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
6. **controllo IgA positivo, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
7. **coniugato IgA 2 (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con FCS e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
8. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 11ml**, pronta per l'uso
9. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso

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. Dopo aver staccato i pozzetti individuali occorrenti, conservare le rimanenti strisce di pozzetti in sacchetto chiuso con essiccante a 2-8°C. Subito dopo l'uso, riporre i reattivi in ambiente a 2-8°C.

- Il coniugato pronto per l'uso e la soluzione per substrato TMB sono sensibili alla luce e devono essere conservati al riparo dalla luce. Se per l'azione della luce si sviluppa nella soluzione per substrato un'alterazione del colore, la soluzione deve essere eliminata.
- Prelevare soltanto la quantità di coniugato o di TMB necessaria per il test da eseguire. L'eventuale quantità di coniugato o TMB in eccesso non può essere rimessa nel recipiente originale, ma deve essere eliminata.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	diluiti	da +2 a +8°C	max. 6 ore
	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Micropiastra	dopo l'apertura	da +2 a +8° (conservazione nella busta in dotazione con sacchetto di essiccante)	3 mesi
Assorbente di fattore reumatoide	non diluiti, dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	1 settimana
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Tetrametilbenzidina	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione bloccante	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +25°C	4 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

- Sono impiegati come sieri di controllo esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per gli anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV e verso l'antigene di superficie dell'epatite B. Tuttavia i campioni, i campioni diluiti, i controlli, i coniugati e le strisce per microtitolazione devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
- I componenti che contengono conservanti, come pure la soluzione bloccante al citrato e il TMB, sono irritanti per la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questi materiali, lavare immediatamente la parte interessata sotto acqua corrente e consultare eventualmente un medico.
- Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

- Acqua distillata/demineralizzata
- Pipetta a 8 canali 50µl, 100µl
- Micropipette: 10µl, 100µl, 1000µl
- Provette per i campioni
- Salviette di carta o carta assorbente
- Pellicola protettiva per piastre ELISA
- Contenitore per rifiuti infetti
- Lavatore a mano ELISA o lavatrice automatica per micropiastre
- Spettrofotometro per micropiastre con filtro 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)
- Incubatore

7. Esecuzione del test

Seguire scrupolosamente il metodo prescritto da VIROTECH Diagnostics è il requisito indispensabile per ottenere i risultati corretti.

7.1 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.

Preparare le diluizioni per i pazienti sempre fresche.

Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente il siero.

- Utilizzare solo siero fresco e non inattivato.

2. Non impiegare campioni iperlipemici, emolitici e contaminati da batteri, né sieri torbidi (falsi positivi/negativi).

7.2 Preparazione dei reattivi

La VIROTECH Diagnostics System Diagnostica consente una grande flessibilità grazie alla possibilità offerta di impiegare tamponi di diluizione e lavaggio, TMB, soluzione bloccante di citrato e coniugato che soddisfano una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli pronti per l'uso sono specifici dei parametri e da impiegare esclusivamente con le piastre indicate dal certificato del controllo qualità.

1. Regolare l'incubatore su 37°C e verificare che questa temperatura sia stata raggiunta prima dell'inizio dell'incubazione.
2. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente; aprire la confezione delle strisce di reazione solo una volta raggiunta questa temperatura.
3. Agitare bene tutti i componenti liquidi prima dell'uso.
4. Diluire la soluzione concentrata per lavaggio con acqua distillata/demineralizzata fino a ottenere 1 litro (in caso di formazione di cristalli del concentrato, portarlo a temperatura ambiente prima della diluizione e agitare bene prima dell'uso).
5. **Per una determinazione corretta delle IgA anti-tossina pertussica è necessario trattare preventivamente i sieri con RF-SorboTech** (assorbente VIROTECH). I controlli IgA non richiedono il preadsorbimento.

7.3 Esecuzione del test VIROTECH ELISA

1. Per ogni serie di test, dispensare 100µl del tampone di diluizione pronto per l'uso (bianco), dei controlli e dei sieri diluiti dei pazienti. Raccomandiamo sempre una doppia serie (bianco, controlli e sieri pazienti); per i controlli cut off e di calibrazione la doppia serie è obbligatoria. Diluizione operativa dei sieri dei pazienti: 1+100; ad es. 10µl di siero + 1ml di tampone di diluizione.
2. La dispensazione è seguita da un'incubazione per 30 min a 37 °C (con pellicola protettiva).
3. Il periodo d'incubazione viene concluso da 4 lavaggi, ciascuno eseguito con 350-400µl di soluzione di lavaggio per ogni pozzetto. Non lasciare la soluzione di lavaggio nei pozzetti. Gli ultimi residui di liquido devono essere eliminati rovesciando e battendo la piastra su un foglio di carta assorbente.
4. Dispensare 100µl del coniugato pronto per l'uso in tutti i pozzetti.
5. Incubazione del coniugato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva).
6. Terminare l'incubazione del coniugato mediante 4 lavaggi (vedere punto 3).
7. Dispensare in ogni pozzetto 100µl della soluzione per substrato TMB pronta per l'uso.
8. Incubazione della soluzione per substrato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva, tenere al buio).
9. Bloccaggio della reazione del substrato: dispensare 50µl della soluzione bloccante di citrato in ciascun pozzetto. Agitare con cautela e accuratamente la piastra fino alla completa miscelazione dei liquidi e alla comparsa di una colorazione gialla uniforme.
10. Misurare le estinzioni (DO) a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm). Regolare il fotometro in modo da poter sottrarre da tutte le altre estinzioni il valore del bianco misurato. La misurazione fotometrica dovrebbe essere effettuata entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

7.4 Impiego di strumenti ELISA

Tutti i test ELISA VIROTECH Diagnostics possono essere elaborati con strumenti ELISA. L'utilizzatore è tenuto ad eseguire regolari convalide dell'apparecchiatura.

I prodotti ELISA della G.V. sono stati validati sui seguenti analizzatori ELISA (quali Immunozone, Plato 1300GSG, Plato 3300 GSG, e Monet TKA). L'utilizzatore dovrà regolarmente verificare la costante affidabilità del sistema con la seguente procedura:

1. In caso di installazione o di importanti riparazioni del processore ELISA, VIROTECH Diagnostics raccomanda di eseguire la convalida dell'apparecchio secondo le indicazioni del costruttore.
2. Si raccomanda di controllare poi il processore ELISA con il kit di convalida (EC250.00). Questo regolare controllo con il kit di convalida dovrebbe essere eseguito almeno una volta ogni tre mesi.
3. Ogni ciclo di test eseguito deve rispondere ai criteri di idoneità del certificato di controllo qualità allegato al prodotto.

Questa procedura garantisce il perfetto funzionamento del processore ELISA e serve inoltre anche alla garanzia di qualità del laboratorio.

8. Valutazione del test qualitativa e semiquantitativa

I controlli pronti per l'uso servono ad una determinazione semiquantitativa di specifici anticorpi IgG e IgA, la cui concentrazione è indicata in unità VIROTECH (= VE). Le variazioni causate dall'esecuzione del test sono compensate dal metodo di calcolo, ottenendo quindi un'elevata riproducibilità. Per il calcolo delle VE si utilizzano i valori DO medi.

8.1 Controlli funzionali del test

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15.

I valori DO dei controlli negativi dovrebbero essere inferiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità, i valori DO dei controlli positivi e dei controlli cut-off dovrebbero essere superiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità.

b) Unità VIROTECH (VE)

Le unità VIROTECH (VE) dei controlli cut-off sono definite pari a 10 VE. Le unità VE calcolate dei controlli positivi devono rientrare nei range indicati dal certificato di controllo qualità.

Se tali requisiti (valori DO, VE) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

8.2 Calcolo delle unità VIROTECH (VE)

L'estinzione del valore bianco (450/620nm) deve essere sottratta da tutte le estinzioni.

$$VE_{\text{(controlli positivi)}} = \frac{DO_{\text{(controlli positivi)}}}{DO_{\text{(controlli cut - off)}}} \times 10$$
$$VE_{\text{(siero paziente)}} = \frac{DO_{\text{(siero paziente)}}}{DO_{\text{(controlli cut - off)}}} \times 10$$

8.3 Schema di valutazione delle IgG

Le unità VIROTECH (VE) del test ELISA per le IgG anti-tossina pertussica sono state calibrate con lo Standard Internazionale OMS. Ne è derivata la correlazione indicata nella valutazione tra unità VIROTECH (VE) e unità internazionali per millilitro (IU/ml) per le IgG (7).

IU/ml (OMS)	VE	Anticorpi IgG	Interpretazione
	< 9	negativo	\Rightarrow nessun aumento del titolo Ak contro la tossina pertussica: <ul style="list-style-type: none">nessun sospetto di infezione da <i>B. pertussis</i> In presenza di sintomi clinici, richiedere controlli a distanza di tempo o diagnosi differenziale
36-44	9 – 11	al limite	\Rightarrow aumento del titolo Ak contro la tossina pertussica: <ul style="list-style-type: none">Ak persistente di un'infezione pregressaAk di un inizio di risposta immunitariaanticorpi da vaccinazione
	> 11	positivo	\Rightarrow aumento significativo del titolo Ak contro la tossina pertussica: <ul style="list-style-type: none">indizio di un'infezione recente o appena superatariconoscimento degli anticorpi da vaccinazione: indispensabile tenere presente le date delle vaccinazioni, in quanto il test non è in grado di distinguere tra gli anticorpi originati dalla vaccinazione o da un'infezione
≥ 100	≥ 17	infezione	\Rightarrow aumento significativo del titolo Ak contro la tossina pertussica, indizio di un'infezione acuta se l'ultima vaccinazione è stata eseguita da più di 12 mesi

8.4 Schema di valutazione delle IgA

Il test ELISA per le IgA anti-tossina pertussica è stato equiparato allo Standard Internazionale OMS. Ne è derivata la correlazione indicata nella valutazione tra unità VIROTECH (VE) e unità internazionali per millilitro (IU/ml) per le IgA (11, 12).

UI/ml (OMS)	VE	Anticorpi IgA	Interpretazione
< 12 UI/ml	< 9	negativo	⇒ <i>nessun aumento del titolo Ak contro la tossina pertussica:</i> <ul style="list-style-type: none"> nessun sospetto di infezione da <i>B. pertussis</i> In presenza di sintomi clinici, richiedere controlli a distanza di tempo o diagnosi differenziale
	9 – 11	al limite	⇒ <i>aumento del titolo Ak contro la tossina pertussica:</i> <ul style="list-style-type: none"> Ak persistente di un'infezione pregressa Ak di un inizio di risposta immunitaria anticorpi da vaccinazione
≥ 12 UI/ml	> 11	positivo	⇒ <i>aumento significativo del titolo Ak contro la tossina pertussica:</i> In caso di titolo Ak IgG ulteriormente positivo (> 11 VE): <ul style="list-style-type: none"> indizio di un'infezione recente o appena superata riconoscimento degli anticorpi da vaccinazione: indispensabile tenere presente le date delle vaccinazioni, in quanto il test non è in grado di distinguere tra gli anticorpi originati dalla vaccinazione o da un'infezione In caso di titolo Ak IgG ulteriormente negativo/ al limite (≤ 11 VE): <ul style="list-style-type: none"> richiedere controllo di andamento.

Avvertenza: gli anticorpi IgA non sempre si formano e costituiscono quindi un marker meno affidabile degli anticorpi IgG di un'infezione da *Bordetella pertussis*.

1. E' indispensabile tenere presente le date delle vaccinazioni, in quanto il test non è in grado di distinguere tra gli anticorpi originati dalla vaccinazione o da un'infezione
2. Se le VE misurate del campione sono superiori alla zona limite, i campioni sono considerati positivi.
3. Se le VE misurate si trovano nella zona limite, ma in assenza di concentrazioni significative di anticorpi, i campioni sono considerati al limite. Per accertare con sicurezza la presenza di un'infezione, è necessario determinare il livello di anticorpi di due campioni di siero. Uno dei campioni deve essere testato subito dopo l'inizio dell'infezione, un secondo campione dopo 5-10 giorni (siero convalescente). La concentrazione di anticorpi dei due campioni deve essere determinata in parallelo, cioè nella stessa serie di test. Non è possibile ottenere una diagnosi corretta sulla base della valutazione di un singolo campione.
4. Se i valori misurati sono al di sotto della zona limite definita, il campione non contiene anticorpi specifici dell'antigene in misura rilevabile. I campioni sono quindi considerati negativi.
5. Con un risultato per le IgA al limite e in presenza di un risultato per le IgG <17 VE, è necessario un secondo campione di siero per confermare un'infezione acuta.

8.5 Limiti del test

L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio eventualmente disponibili.

9. Valutazione quantitativa del test delle IgG in IU/ml

Il controllo di calibrazione pronto per l'uso è disponibile separatamente con il set di quantificazione IgG (EN215Q60) e consente la determinazione quantitativa in UI/ml di anticorpi IgG anti-PT nel siero del paziente. Il controllo di calibrazione compensa le oscillazioni dovute all'esecuzione del test. Per il calcolo si utilizzano i valori DO medi.

9.1 Controlli funzionali del test

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15.

Il valore DO del controllo di calibrazione deve trovarsi entro i limiti indicati nel relativo certificato.

b) UI/ml

La concentrazione di IgG anti-PT (UI/ml) del controllo debolmente reattivo e del controllo altamente reattivo deve essere compresa entro i valori indicati sul certificato di controllo qualità.

Se tali requisiti (valori OD, UI/ml) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

9.2 Calcolo dei risultati quantitativi in Unità Internazionali al millilitro (UI/ml)

L'estinzione del valore bianco (450/620 nm) deve essere sottratta da tutte le estinzioni.

La quantificazione dei sieri dei pazienti con il set di quantificazione IgG VIROTECH avviene tramite correlazione con lo Standard Internazionale OMS. Tramite test completi, si determina la curva standard per ogni lotto di piastre mediante regressione non lineare, curva descritta matematicamente dalla seguente formula (14):

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

Dove

- A: è il valore DO previsto in caso di concentrazione di IgG anti-PT pari a 0
 B: è il fattore d'incremento
 C: è il punto d'inversione
 D: è il valore DO previsto in caso di concentrazione di IgG anti-PT infinitamente alta
 DO corr: è il valore DO corretto del siero del paziente

Al fine di tenere conto delle oscillazioni nell'ambito dell'elaborazione del test, si corregge il valore DO misurato del siero del paziente sulla scorta di un controllo di calibrazione:

$$DO \text{ corr} = DO \text{ siero paziente} * \frac{DO \text{ controllo calibrazione predefinita}}{DO \text{ controllo calibrazione misurato}}$$

Per i valori dei parametri A, B, C e D, nonché gli standard relativi ai valori DO del controllo di calibrazione, consultare il certificato.

Determinazione delle UI/ml

La determinazione delle UI/ml può avvenire mediante un software acquistabile presso VIROTECH. In alternativa è possibile disporre di una valutazione predefinita per calcoli correnti su tabella.

La zona limite per la quantificazione con il set di quantificazione IgG anti-tossina pertussica di VIROTECH è compresa tra ≥ 40 UI/ml e < 100 UI/ml, corrispondente ai limiti VE da ≥ 10 VE a < 17 VE.

Il range quantificabile è compreso tra 5 UI/ml e 500 UI/ml.

9.3 Schema di interpretazione IgG

Le unità internazionali (UI/ml) dei test ELISA per le IgG anti-tossina pertussica sono state calibrate secondo lo Standard Internazionale OMS. L'interpretazione corrisponde alle raccomandazioni dei centri di riferimento europei (7, 11, 12, 13, 15).

UI/ml (OMS)	Interpretazione
< 40	Assenza di contatto recente con patogeni.
da ≥ 40 a < 100	Risultato dubbio. Richiedere controllo di andamento oppure determinazione di IgA anti-PT: - IgA anti-PT ≤ 11 VE (corrispondente a < 12 UI/ml): assenza di contatto recente con patogeni. - IgA anti-PT ≥ 11 VE (corrispondente a ≥ 12 UI/ml): presenza di contatto recente con patogeni, purché l'ultimo vaccino risalga a oltre 12 mesi – fare attenzione alle date di vaccinazione!

≥ 100	Presenza di contatto recente con patogeni, purché l'ultimo vaccino risalga a oltre 12 mesi – fare attenzione alle date di vaccinazione!
-------	---

10. Bibliografia

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

Preparazione dei campioni dei pazienti e soluzione di lavaggio

▼ **Soluzione di lavaggio:** diluire il concentrato con acqua distillata/demineralizzata fino ad ottenere 1 litro

**Campioni di IgG – diluizione
1:101**

per es.:

10 µl di siero/plasma + 1000 µl di tampone per diluizione
(il tampone per diluizione del siero è pronto per l'uso)

**Campioni di IgA – diluizione
1:100**

**assorbimento fattore reumatico con RF-
SorboTech**

per es.:

5 µl di siero/plasma + 450 µl di tampone per diluizione + 1
goccia di RF-SorboTech per RT , incubare per 15 min

Esecuzione del test

Preincubazione	30 minuti a 37°C	100 µl campioni pazienti Bianco (tampone per diluizione) e controlli
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione coniugato	30 minuti a 37°C	100 µl coniugato IgG, IgA
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione substrato	30 minuti a 37°C	100 µl substrato
↓		
Bloccaggio		50 µl soluzione bloccante agitare con cautela
↓		
Misurare estinzione		Fotometro a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)