

**VIROTECH Bordetella pertussis (FHA+PT) IgG/IgA ELISA
(B. pertussis FHA+PT IgG/IgA ELISA)**

Bestell-Nr.: EC115.00

Farbcodierung: silber

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

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

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum 21.3.2019

REV 17 / VIROTECH B. pertussis (FHA+PT) IgG/IgA ELISA DE

Inhalt

| | |
|--|----------|
| 1. Verwendungszweck | 3 |
| 2. Diagnostische Bedeutung..... | 3 |
| 3. Testprinzip..... | 3 |
| 4. Packungsinhalt (IgG und IgA Testkit)..... | 3 |
| 5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien | 3 |
| 6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise | 4 |
| 7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert) | 4 |
| 8. Testdurchführung | 4 |
| 8.1 Untersuchungsmaterial | 4 |
| 8.2 Vorbereitung der Reagenzien | 5 |
| 8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung..... | 5 |
| 8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren..... | 5 |
| 9. Testauswertung..... | 6 |
| 9.1 Testfunktionskontrolle | 6 |
| 9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)..... | 6 |
| 9.3 Auswertungsschema IgG und IgA | 6 |
| 9.4 Grenzen des Tests | 6 |
| 10. Leistungsdaten..... | 7 |
| 10.1 Sensitivität und Spezifität | 7 |
| 10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)..... | 7 |
| 10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit) | 7 |
| 11. Literatur | 7 |
| 12. Testablaufschemata..... | 8 |

1. Verwendungszweck

Der VIROTECH Bordetella pertussis (FHA+PT) IgG/IgA ELISA ist ein Screening Test. Der Elisa dient dem qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen PT und FHA im Humanserum.

2. Diagnostische Bedeutung

Der Hauptvertreter der Gattung *Bordetella*, *B. pertussis*, ruft das klinische Krankheitsbild des Keuchhustens hervor. Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese des Keuchhustens ist das Pertussis-Toxin (PT), ein echtes Exotoxin, das für viele physiologische und immunologische Effekte verantwortlich ist. Im Gegensatz zu anderen Exotoxinen der Gattung *Bordetella*, die bei der Serumdiagnostik hohe Kreuzreaktivitäten aufweisen, ist das Pertussis-Toxin hochspezifisch (3). Ein wichtiges Adhärenzprotein für die Anheftung von *B. pertussis* an Schleimhautzellen des Respirationstraktes ist Filamentöses Hämagglutinin (FHA).

Bei einer Primärinfektion sind IgM-Antikörper frühestens 5-10 Tage nach Beginn des Stadiums convulsivum zu finden und persistieren für 6-12 Wochen; sie sind Ausdruck einer akuten Erkrankung. IgA-Antikörper sind frühestens 11 Tage nach Krankheitsbeginn feststellbar und können 6-24 Monate persistieren. Sie werden auch bei Geimpften im Rahmen einer natürlichen Reinfektion (ohne klinische Erkrankung) gebildet und sind deshalb sogar bei gesunden Erwachsenen zu finden. Bei Infektionen von bis zu 12 Monate alten Kindern kommt es in der Regel nicht zur Bildung von IgA-Antikörpern gegen Pertussis-Toxin. Kinder zwischen 1 und 4 Jahren bilden selten, Kinder zwischen 5 und 10 Jahren nur in geringen Konzentrationen IgA-Antikörper gegen Pertussis-Toxin (4). Hier kann der Nachweis von spezifischem IgM als Hinweis auf eine kürzlich durchgemachte Infektion gewertet werden (2). IgG-Antikörper treten frühestens 2-3 Wochen nach Krankheitsbeginn im Serum auf. Reinfektionen sind in der Regel durch erhöhte Antitoxin-IgG- und IgA-Antikörper gekennzeichnet. IgG- und Sekret-IgA-Antikörper sind neben spezifisch sensibilisierten T - Lymphozyten die Träger der Langzeitimmunität (1).

Die Pertussis-Serologie kann den Antigen-Nachweis nicht ersetzen, sollte aber ergänzend durchgeführt werden. Die anti-Pertussis Antikörper werden im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten verzögert gebildet.

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

4. Packungsinhalt (IgG und IgA Testkit)

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgA negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
8. **IgA cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
9. **IgA positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
10. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
11. **IgA-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
12. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
13. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

| Material | Zustand | Lagerung | Haltbarkeit |
|---------------------|-------------------------------|--|-------------|
| Untersuchungsproben | verdünnt | +2 bis +8°C | max. 6h |
| | unverdünnt | +2 bis +8°C | 1Woche |
| Kontrollen | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| MTP | nach Öffnen | +2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel) | 3Monate |
| RF Sorbo Tech | unverdünnt, nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| | verdünnt | +2 bis +8°C | 1Woche |
| Konjugat | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3Monate |
| TMB | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3Monate |
| Stopplösung | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| Waschlösung | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| | endverdünnt (gebrauchsfertig) | +2 bis +25°C | 4Wochen |

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopplösung und TMB, wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
3. Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Reagenzgläser
5. Zellstofftücher
6. Abdeckung für ELISA-Platten
7. Abfallbehälter für infektiöses Material
8. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
9. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
10. Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.

2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen, cut-off und der positiven IgG- und IgA-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, daß der gemessene Leerwert von allen anderen Extink-tionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschema siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden. Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG- und IgA-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

$$\begin{aligned} \text{VE (positive Kontrolle)} &= \frac{\text{OD (positive Kontrolle)}}{\text{OD (cut-off Kontrolle)}} \times 10 \\ \text{VE (Patientenserum)} &= \frac{\text{OD (Patientenserum)}}{\text{OD (cut-off Kontrolle)}} \times 10 \end{aligned}$$

9.3 Auswertungsschema IgG und IgA

| Ergebnis (VE) | Beurteilung |
|---------------|-------------|
| < 9,0 | negativ |
| 9,0 . 11,0 | grenzwertig |
| > 11,0 | positiv |

1. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet (Impfmanagement beachten!).
2. Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen grenzwertigen Bereiches, liegt keine signifikant hohe Antikörperkonzentration vor; die Proben werden als grenzwertig betrachtet. Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen. Eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich.
3. Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.
4. Bei Vorliegen eines positiven IgG- oder positiven IgA-Ergebnisses wird die Bestätigung mit Hilfe des VIROTECH Bordetella pertussis LINE Immunoblots empfohlen.

9.4 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. Bei dem Filamentösen Hämagglutinin (FHA) handelt es sich um ein Gruppenantigen, das auch bei anderen Erregern der Gattung Bordetella (z.B. *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*) gefunden wurde (5,6). Eine Kreuzreaktivität ist daher zu erwarten.

10. Leistungsdaten

10.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität wurden 200 Seren im VIROTECH Bordetella pertussis (FHA+PT) IgG/IgA ELISA getestet und mit dem VIROTECH Pertussis Toxin ELISA verglichen. Das Serenkollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

25 Seren von Patienten mit Verdacht auf Bordetella pertussis Infektion

80 Routineseren (respiratorische Erkrankungen ohne Verdacht auf *Bordetella pertussis*)

95 Blutspenderseren

Serenkollektiv (n= 200)

| VIROTECH Pertussis Toxin ELISA | VIROTECH Bordetella pertussis ELISA IgG | | | VIROTECH Bordetella pertussis ELISA IgA | | |
|--------------------------------------|---|-------------|---------|---|-------------|---------|
| | Negativ | Grenzwertig | Positiv | Negativ | Grenzwertig | Positiv |
| Negativ | 121 | 15 | 34 | 156 | 7 | 17 |
| Grenzwertig | 0 | 0 | 8 | 6 | 2 | 2 |
| Positiv | 0 | 0 | 22 | 2 | 0 | 8 |

Grenzwertige Ergebnisse sind in die Berechnungen der Sensitivität und Spezifität nicht mit einbezogen worden. In Bezug auf den Referenz ELISA ergibt sich für IgG eine Sensitivität von >99,8 % bzw. eine Spezifität von 78,1 % und für IgA eine Sensitivität von 80,0 % bzw. eine Spezifität von 90,2 %.

10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)

Die folgende Tabelle zeigt die Austestung von 80 Blutspenderseren im IgG und 78 Blutspenderseren im IgA.

| | IgG | | IgA | |
|-------------|------|------|------|-----|
| | Anz. | % | Anz. | % |
| Negativ | 54 | 67,5 | 74 | 95 |
| Grenzwertig | 10 | 12,5 | 2 | 2,5 |
| Positiv | 16 | 20,0 | 2 | 2,5 |

10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit einem Serum getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt für IgG < 9% und für IgA < 15%.

11. Literatur

1. Wiersbitzky S. Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt Therapiewoche 25 (1995), p.1485 - 1486
2. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, H. Brandis, W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer, 7. Auflage, p. 483
3. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259
4. 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
5. Elisabeth Bergfors MD et al., Parapertussis and Pertussis: Differences and Similarities in Incidence, Clinical Course, and Antibody Responses, Intern. J. Infet. Dis., 3(3):1999
6. Jacob-Dubuisson F et al., Molecular characterization of *Bordetella bronchiseptica* filamentous haemagglutinin and its secretory machinery, Microbiology (2000), 146,1211-1221

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

Waschlösung: Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

**IgG/IgA-Proben Æ Verdünnung
1:101**

z.B.:

10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

Testdurchführung

