

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

Bestell-Nr.: EC215G00

B. pertussis PT IgG Quant.-Set

Bestell-Nr.: EN215Q60

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

Bestell-Nr.: EC215A00

**Farbcodierung:
IgG: silber/dunkelblau
IgA: silber/schwarz**

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

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



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt	3
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	5
8. Testdurchführung	5
8.1 Untersuchungsmaterial	5
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	6
9. Testauswertung qualitativ und semiquantitativ	6
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)	6
9.3 Auswertungsschema IgG	7
9.4 Auswertungsschema IgA	7
9.5 Grenzen des Tests	8
10. IgG Testauswertung quantitativ in IU/ml	8
10.1 Testfunktionskontrolle	8
10.2 Berechnung der quantitativen Ergebnisse in internationalen Units pro Milliliter (IU/ml)	8
10.3 Interpretationsschema IgG	9
11. Leistungsdaten	9
11.1 Sensitivität und Spezifität	9
11.2 Kreuzreaktivität	9
11.3 Durchseuchung (erwartete Werte)	10
11.4 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	10
11.5 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	10
11.6 Verteilung der Antikörperkonzentrationen (in VE) von Seren mit/ohne Pertussisverdacht	11
11.7 Korrelation der deklarierten und gemessenen IU/ml	11
12. Literatur	12
13. Testablaufschema	13

1. Verwendungszweck

Der Pertussis Toxin ELISA weist semiquantitativ und qualitativ IgG- oder IgA-Antikörper in Humanserum nach. Er dient dem Nachweis einer akuten Infektion oder einer kürzlich durchgemachten Infektion bzw. der Detektion von Impfantikörpern (Impferfolgskontrolle). Im IgG ist des Weiteren eine Quantifizierung in internationalen Units pro Milliliter (IU/ml) möglich, unter Anwendung des separat erhältlichen IgG Quantifizierungs-Sets (EN215Q60).

2. Diagnostische Bedeutung

Der Hauptvertreter der Gattung *Bordetella*, *B. pertussis*, ruft das klinische Krankheitsbild des Keuchhustens hervor. Mildere Verlaufsformen, verursacht von *B. parapertussis*, werden von dem Pertussis Toxin ELISA nicht erfasst.

Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese des Keuchhustens ist das Pertussis-Toxin, 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 (4).

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. IgA-Antikörper 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 (6). Hier kann der Nachweis von spezifischem IgM als Hinweis auf eine kürzlich durchgemachte Infektion gewertet werden (3). 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 (2).

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.

Seit 2009 existiert mit dem WHO-International Standard Pertussis Antiserum (NIBSC code: 06/140) ein Referenz-Serum, mit dem die standardisierte und exakte Quantifizierung der anti-PT IgG Konzentration eines Patientenserums in International Units/ml möglich ist. Von den Bordetella-Referenzzentren mehrerer Länder ist vorgeschlagen worden, mit diesem Standardserum ein Zwei-Cut-off-System mit der unteren Grenze von 40/ 50 IU/ml und der oberen Grenze von 100/ 120 IU/ml einzusetzen (11, 12, 13).

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

4.1 IgG 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, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
8. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
9. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

4.2 IgG Quantifizierungs-Set

1. **IgG Kalibrierungskontrolle, 2000 µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
2. **IgG schwach reaktive Kontrolle, 2000 µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
3. **IgG stark reaktive Kontrolle, 2000 µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig

4.3 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. **IgA negative Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgA cut-off Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgA positive Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgA-Konjugat 2 (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
8. Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5' TMB), 11ml, gebrauchsfertig
9. **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 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).
5. **Für eine korrekte Pertussis Toxin IgA-Bestimmung ist es erforderlich, die Seren mit RF-SorboTech (VIROTECH-Adsorptionsmittel) vorzubehandeln.** Bei IgA-Kontrollen entfällt die Voradsorption.

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der Kontrollen und der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off und Kalibrierungskontrolle 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 Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschemata 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 qualitativ und semiquantitativ

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.

$$VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{OD \text{ (positive Kontrolle)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$$

$$VE \text{ (Patientenserum)} = \frac{OD \text{ (Patientenserum)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$$

9.3 Auswertungsschema IgG

Die VIROTECH Einheiten (VE) des Pertussis Toxin IgG ELISAs wurden mit dem WHO-International Standard kalibriert. Daraus ergibt sich die in der Auswertung angegebene Korrelation zwischen VIROTECH-Einheiten (VE) und internationaler Units pro Milliliter (IU/ml) für IgG (7).

IU/ml (WHO)	VE	IgG- Antikörper	Interpretation
	< 9	negativ	⇒ <i>kein erhöhter Ak-Titer gegen Pertussis-Toxin:</i> <ul style="list-style-type: none"> kein Verdacht auf eine <i>B. pertussis</i>-Infektion Bei Vorliegen einer klinischen Symptomatik Verlaufskontrolle anfordern oder differentialdiagnostisch abklären
36-44	9 – 11	grenzwertig	⇒ <i>erhöhter Ak -Titer gegen Pertussis -Toxin:</i> <ul style="list-style-type: none"> persistierende Ak einer zurückliegenden Infektion Ak einer beginnenden Immunantwort Impfantikörper
	> 11	positiv	⇒ <i>signifikant hoher Ak -Titer gegen Pertussis-Toxin:</i> <ul style="list-style-type: none"> Hinweis auf eine frische oder kürzlich durchgemachte Infektion Erkennung von Impfantikörpern: Impfmanagement unbedingt beachten, da der Test nicht zwischen Impfantikörpern und Infektions-antikörpern unterscheiden kann
≥ 100	≥ 17	Infektion	⇒ <i>signifikant hoher Ak -Titer gegen Pertussis-Toxin, der für eine akute Infektion spricht, wenn die letzte Impfung länger als 12 Monate zurückliegt</i>

9.4 Auswertungsschema IgA

Der Pertussis Toxin IgA ELISA wurde an den WHO-International Standard angeglichen. Daraus ergibt sich die in der Auswertung angegebene Korrelation zwischen VIROTECH-Einheiten (VE) und internationaler Units pro Milliliter (IU/ml) für IgA (11, 12).

IU/ml (WHO)	VE	IgA- Antikörper	Interpretation
< 12 IU/ml	< 9	negativ	⇒ <i>kein erhöhter Ak-Titer gegen Pertussis-Toxin:</i> <ul style="list-style-type: none"> kein Verdacht auf eine <i>B. pertussis</i>-Infektion Bei Vorliegen einer klinischen Symptomatik Verlaufskontrolle anfordern oder differentialdiagnostisch abklären
	9 – 11	grenzwertig	⇒ <i>erhöhter Ak -Titer gegen Pertussis -Toxin:</i> <ul style="list-style-type: none"> persistierende Ak einer zurückliegenden Infektion Ak einer beginnenden Immunantwort Impfantikörper
≥ 12 IU/ml	> 11	positiv	⇒ <i>signifikant hoher Ak -Titer gegen Pertussis-Toxin:</i> Bei zusätzlich positivem IgG-Ak-Titer (> 11 VE): <ul style="list-style-type: none"> Hinweis auf eine frische oder kürzlich durchgemachte Infektion Erkennung von Impfantikörpern: Impfmanagement unbedingt beachten, da der Test nicht zwischen Impfantikörpern und Infektionsantikörpern unterscheiden kann Bei zusätzlich negativ/ grenzwertigem IgG-Ak-Titer (≤ 11 VE): <ul style="list-style-type: none"> Verlaufskontrolle anfordern.

Hinweis: IgA-Antikörper werden nicht immer gebildet und sind somit ein weniger verlässlicher Marker für eine *Bordetella pertussis*- Infektion als IgG-Antikörper.

1. Impfmanagement unbedingt beachten, da der Test nicht zwischen Impfantikörpern und Infektionsantikörpern unterscheiden kann.
2. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
3. 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.
4. Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.
5. Bei einem grenzwertigen IgA-Ergebnis und dem Vorliegen eines IgG Resultates <17 VE ist zur Abklärung einer akuten Infektion eine zweite Serumprobe erforderlich.

9.5 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

10. IgG Testauswertung quantitativ in IU/ml

Die gebrauchsfertige Kalibrierungskontrolle ist separat mit dem IgG Quantifizierungs-Set (EN215Q60) erhältlich und dient der quantitativen Bestimmung in IU/ml von anti-PT IgG Antikörpern im Patientenserum. Die Kalibrierungskontrolle gleicht die durch Testdurchführung bedingten Schwankungen aus. Für die Berechnung werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

10.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

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

Der OD-Wert der Kalibrierungskontrolle muss in dem auf dem dazugehörigen Zertifikat angegebenen Bereich liegen.

b) IU/ml

Die anti-PT IgG-Konzentrationen (IU/ml) der schwach reaktiven Kontrolle und der stark reaktiven Kontrolle müssen innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

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

10.2 Berechnung der quantitativen Ergebnisse in internationalen Units pro Milliliter (IU/ml)

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

Die Quantifizierung der Patientenseren mit dem VIROTECH IgG Quantifizierungs-Set erfolgt durch Korrelation mit dem WHO-International Standard. Durch umfassende Testungen wird für jede Plattencharge die Standardkurve durch nicht-lineare Regression bestimmt und mathematisch durch folgende Formel beschrieben (14):

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

Hierbei ist

- A: erwartete OD bei einer anti-PT IgG Konzentration von 0
- B: Steigungsfaktor
- C: Wendepunkt
- D: erwartete OD bei einer unendlich hohen anti-PT IgG Konzentration
- OD korr: korrigierte OD des Patientenserums

Zur Berücksichtigung von Schwankungen innerhalb der Testabarbeitung wird die gemessene OD des Patientenserums anhand einer Kalibrierungskontrolle korrigiert:

$$\text{OD korr} = \text{OD Patientenserum} * \frac{\text{OD Kalibrierungskontrolle ZW}}{\text{OD Kalibrierungskontrolle gemessen}}$$

Die Werte der Parameter A, B, C und D, wie auch die Vorgabe für die OD der Kalibrierungskontrolle, sind dem Zertifikat zu entnehmen.

Bestimmung der IU/ml

Die Bestimmung der IU/ml kann durch eine Software erfolgen, die von VIROTECH bezogen werden kann. Alternativ kann eine Auswertevorlage für gängige Tabellenkalkulationen zur Verfügung gestellt werden.

Der grenzwertige Bereich bei der Quantifizierung mit dem VIROTECH Pertussis Toxin IgG Quantifizierungs-Set ist von ≥ 40 IU/ml bis < 100 IU/ml definiert, was dem VE-Bereich von ≥ 10 VE bis < 17 VE entspricht.

Der quantifizierbare Bereich liegt zwischen 5 IU/ml und 500 IU/ml.

10.3 Interpretationsschema IgG

Die internationalen Einheiten (IU/ml) des Pertussis Toxin IgG ELISAs wurden mit dem WHO-International Standard kalibriert. Die Interpretation entspricht den Empfehlungen europäischer Referenzzentren (7, 11, 12, 13, 15).

IU/ml (WHO)	Interpretation
< 40	Kein Anhalt für kürzlichen Erregerkontakt.
≥ 40 bis < 100	Fragliches Ergebnis. Verlaufskontrolle anfordern oder Bestimmung von IgA-anti-PT: - IgA-anti-PT ≤ 11 VE (entspricht < 12 IU/ml): Kein Anhalt für kürzlichen Erregerkontakt. - IgA-anti-PT > 11 VE (entspricht ≥ 12 IU/ml): Anhalt für kürzlichen Erregerkontakt, vorausgesetzt die letzte Impfung liegt länger als 12 Monate zurück - Impfmanagement beachten!
≥ 100	Anhalt für kürzlichen Erregerkontakt, vorausgesetzt die letzte Impfung liegt länger als 12 Monate zurück -Impfmanagement beachten!

11. Leistungsdaten

11.1 Sensitivität und Spezifität

Es wurden 151 Seren mit Verdacht auf eine *Bordetella pertussis* Infektion in einer internen Studie auf anti-PT IgG getestet. Diese Seren wurden im Neutralisationstest (NT) durch ein ehemaliges Referenzzentrum vorbestimmt. Als Vergleichstest diente der VIROTECH Bordetella pertussis LINE (Line-Immuno-Assay).

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Serenkollektiv (n= 151)

VIROTECH LINE IgG	VIROTECH Pertussis Toxin ELISA IgG		
	Negativ	Grenzwertig	Positiv
Negativ	76	1	1
Grenzwertig	6	1	7
Positiv	2	1	56

Grenzwertige Ergebnisse sind in die Berechnungen der Sensitivität und Spezifität nicht mit einbezogen worden. In Bezug auf den Bordetella pertussis LINE ergibt sich für IgG eine Sensitivität von 96,6 % bzw. eine Spezifität von 98,7 %.

11.2 Kreuzreaktivität

Zur Überprüfung eventueller Kreuzreaktionen des VIROTECH Pertussis Toxin ELISAs mit Antikörpern aus respiratorischen Erkrankungen wurden 37 Seren im IgG und 33 Seren im IgA überprüft.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

	IgG	IgA
Negativ	29	33
Grenzwertig	4	0
Positiv	4	0

Das Resultat zeigt, dass der VIROTECH Pertussis Toxin ELISA zum differentialdiagnostischen Einsatz sehr gut geeignet ist.

11.3 Durchseuchung (erwartete Werte)

Die folgende Tabelle zeigt die Austestung von 80, bzw. 78 Seren von Blutspendern:

	IgG	IgA
Negativ	73	78
Grenzwertig	3	0
Positiv	4	0

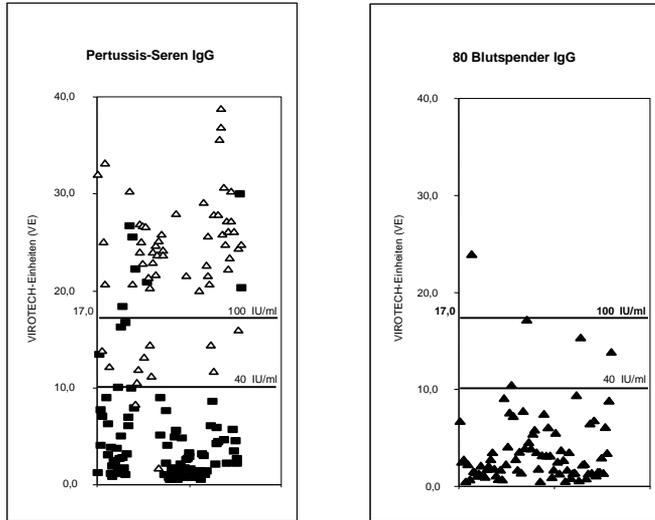
11.4 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit zwei Seren schachbrettartig getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten betragen für IgG < 9% und für IgA < 15%.

11.5 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In mindestens 10 unabhängigen Testansätzen wurden an 3 verschiedenen Testtagen mindestens 3 Seren getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten betragen $\leq 15\%$.

11.6 Verteilung der Antikörperkonzentrationen (in VE) von Seren mit/ohne Pertussisverdacht



Der Großteil der negativen Pertussis-Seren im IgG liegt unter der 10 VE-Grenze, der Großteil der positiven über der 17 VE-Grenze.

Im Bereich zw. 10 und 17 VEs liegen positive Seren, deren Ak aus zurückliegenden oder aufkommenden Infektionen stammen können.

Über 17 VEs liegen signifikant hohe Ak-Titer, die für eine akute Infektion sprechen, wenn die Impfung mehr als 12 Monate zurückliegt.

Bei den Blutspenderseren liegt der Großteil der negativen Seren unter der 10 VE-Grenze.

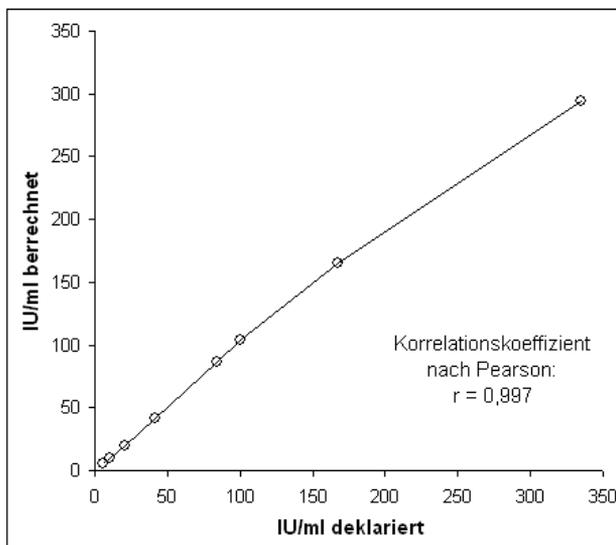
im LINE¹ vorbestimmte positive Seren
 Blutspender

 im LINE¹ vorbestimmte negative Seren

¹ Line-Immuno-Assay der Firma VIROTECH

11.7 Korrelation der deklarierten und gemessenen IU/ml

In der folgenden Graphik ist die Korrelation der deklarierten IU/ml mehrerer Verdünnungen des WHO-International Standard mit den IU/ml, die mit dem VIROTECH Pertussis Toxin IgG ELISA bestimmt wurden, dargestellt. Der hier berechnete Korrelationskoeffizient nach Pearson belegt die sehr gute Übereinstimmung der berechneten mit den deklarierten Werten.



12. Literatur

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springerverlag 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

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

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

IgG-Proben – Verdünnung
1:101

z.B.:
10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

IgA-Proben – Verdünnung
1:100

z.B.:
5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer +
1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren

Testdurchführung

