

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

Bestell-Nr.: EC215M00

Farbcodierung: blau metallic/transparent

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 (IgM 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	4
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung.....	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	5
9. Testauswertung.....	5
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE).....	6
9.3 Auswertungsschema IgM.....	6
9.4 Grenzen des Tests.....	6
10. Leistungsdaten.....	7
10.1 Durchseuchung (erwartete Werte)	7
10.2 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	7
10.3 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	7
11. Literatur.....	7
12. Testablaufschem.....	8

1. Verwendungszweck

Der Pertussis Toxin ELISA weist semiquantitativ und qualitativ IgM-Antikörper in Humanserum nach. Er dient dem Nachweis einer akuten Infektion oder einer kürzlich durchgemachten Infektion.

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.

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 (IgM 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. **IgM negative Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgM cut-off Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgM positive Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgM-Konjugat (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.

- 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

- 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.
- 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.
- Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

- Aqua dest./demin.
- Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
- Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
- Reagenzgläser
- Zellstofftücher
- Abdeckung für ELISA-Platten
- Abfallbehälter für infektiöses Material
- ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
- 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.

- Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
- 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 Waschlösung, 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).
5. Hohe IgG-Titer oder Rheumafaktoren können den spezifischen Nachweis von IgM-Antikörpern stören und zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. **Für eine korrekte IgM-Bestimmung ist es daher erforderlich, die Seren mit RF-SorboTech (VIROTECH-Adsorptionsmittel) vorzubehandeln.** Bei IgM-Kontrollen entfällt die Voradsorption.

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen-, cut-off und der positiven IgM-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenserum pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenserum); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenserum: 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.

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 IgM-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 Kontrolle sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrolle sowie der cut-off Kontrolle sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

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

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

9.3 Auswertungsschema IgM

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

1. IgM-Antikörper werden nicht immer gebildet und sind somit ein weniger verlässlicher Marker für eine *Bordetella pertussis*-Infektion als IgG-Antikörper.
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 IgM-Ergebnis und dem Vorliegen eines IgG Resultates <18 VE ist zur Abklärung einer akuten Infektion eine zweite Serumprobe erforderlich.

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.

10. Leistungsdaten

10.1 Durchseuchung (erwartete Werte)

Die folgende Tabelle zeigt die Austestung von jeweils 80 Blutspendern:

	IgM
Negativ	79
Grenzwertig	1
Positiv	0

10.2 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

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

10.3 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 3 Seren getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten liegen unter 15%.

11. Literatur

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springerverlag 1991, p.361 - 363
2. Wiersbitzky S. Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt Therapiewoche 25 (1995), p.1485 - 1486
3. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, H. Brandis, W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer, 7. Auflage, p. 483
4. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259
5. 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
6. 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
7. De Melker, H.E. 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*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38(2), 800-806
8. Swidsinski, S. Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, April 1997
9. 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.
10. B. Meijer, Oktober 2002, Numerical Comparison of 4 Pertussis Toxin IgG-ELISAs, nicht publiziert, Krankenhaus Groningen, NL

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

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

▼ **IgM-Proben – Verdünnung**

1:101

Rheumafaktoradsorption mit RF-SorboTech

z.B.:

5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer +

1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren

Testdurchführung

Probeninkubation

30 Minuten bei 37°C

100 µl Patientenproben

Leerwert (Verdünnungspuffer) und Kontrolle



4 x Waschen



Konjugatinkubation

30 Minuten bei 37°C

100 µl Konjugat

IgM



4 x Waschen



Substratinkubation

30 Minuten bei 37°C

100 µl Substrat



Abstoppen



Extinktion messen

50 µl Stopplösung

vorsichtig schütteln

Photometer bei 450/620nm
(Referenzwellenlänge 620-690nm)