

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgG LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-32)

Bestell-Nr.: WE116G32

(B. pertussis + CatACT IgG LINE-96)

Bestell-Nr.: WE116G96

VIROTECH Bordetella pertussis + CatACT IgA LINE Immunoblot

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-32)

Bestell-Nr.: WE116A32

(B. pertussis + CatACT IgA LINE-96)

Bestell-Nr.: WE116A96

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: 30.10.2018

REV 9 / VIROTECH B. pertussis + CatACT IgA & IgG LINE Immunoblot DE

Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung.....	3
3. Testprinzip.....	3
4. Packungsinhalt.....	4
4.1 Kit für 32 Bestimmungen	4
4.2 Kit für 96 Bestimmungen	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	5
8. Untersuchungsmaterial.....	5
9. Testdurchführung	5
9.1 Vorbereitung der Proben	5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien	6
9.3 Immunoblot Testdurchführung	6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren	7
10. Testauswertung.....	7
10.1 Auswertung der Patientenproben	7
10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle	7
10.3 Bedeutung der Antigene.....	7
10.4 Auswertungskriterien	8
10.5 Grenzen des Tests	9
11. Leistungsdaten.....	9
11.1 Sensitivität und Spezifität	9
11.2 Kreuzreaktivität	10
11.3 Durchseuchung (Erwartete Werte)	10
11.4 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)	10
11.5 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)	10
11.6 Impfantikörper	11
12. zusätzliche Leistungsdaten für die CatACT Bande im IgG.....	11
12.1 Sensitivität und Spezifität der CatACT Bande im IgG.....	11
13. zusätzliche Leistungsdaten für <i>Bordetella parapertussis</i> im IgG und IgA	11
13.1 Sensitivität und Spezifität für <i>Bordetella parapertussis</i>	11
14. Literatur	11
15. Testablaufschema	13

1. Verwendungszweck

Line Immunoblot Testkit zum qualitativen Nachweis von *Bordetella pertussis* spezifischen IgG- bzw. IgA- Antikörpern in Humanserum. Das Kit dient der Erkennung einer frischen, kürzlich oder vor längerer Zeit durchgemachten Infektion mit *Bordetella pertussis* oder zur Differentialdiagnose von länger andauernden klinischen Manifestationen mit nicht charakteristischem Husten. Durch den gleichzeitigen Nachweis spezifischer Antikörper gegen Pertussis-Toxin (PT) und den katalytischen Teil des Adenylat Cyclase Toxins (CatACT) kann in den meisten Fällen die Unterscheidung zwischen einer *Bordetella pertussis*-Infektion und einer Impfung erleichtert werden.

Weiterhin kann der Line Immunoblot einen Hinweis auf eine mögliche Infektion mit *B. parapertussis* geben. Das Fehlen von spezifischen Antikörpern gegen PT bei gleichzeitigem Auftreten von Antikörpern gegen CatACT [genus-spezifisch] (17) und FHA kann als ein Hinweis auf eine *B. parapertussis* Infektion gewertet werden.

2. Diagnostische Bedeutung

Der Hauptvertreter der Gattung *Bordetella*, *B. pertussis*, ruft das klinische Krankheitsbild des Keuchhustens hervor. Mildere Verlaufsformen werden von *B. parapertussis* verursacht.

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 nachweisbar 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 (1). IgA- und IgM- Antikörper werden nicht immer gebildet und sind somit ein weniger verlässlicher Marker für eine *Bordetella pertussis*-Infektion als IgG-Antikörper.

Die Antikörperproduktion beginnt zu unterschiedlichen Zeiten bei verschiedenen Patienten, aber frühestens in der zweiten Woche des Stadiums Convulsivum (IgG ist frühestens 2-3 Wochen nach Beginn der Infektion vorhanden) und erreicht in der sechsten bis achten Woche nach Beginn des paroxymalen Hustens sein Maximum. Aus diesem Grund wird für die *Bordetella* Diagnostik die Bestimmung eines Erstserums empfohlen, das 2 Wochen nach dem Beginn des paroxymalen Hustens abgenommen wurde und eines Zweitserums 3 bis 5 Wochen danach.

Reinfektionen sind in der Regel durch erhöhte Antitoxin-IgG- und IgA-Antikörper gekennzeichnet. (2).

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 (3, 14, 15).

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

Proteine von *B. pertussis* werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Humanserum/-plasma-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit den auf den Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschriffe, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG- bzw. IgA- Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschriff entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blau-violette Banden (fAntigen-Banden) erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der Nitrozellulosestreifen mit Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG- bzw. IgA-Antikörpern schließen.

4. Packungsinhalt

4.1 Kit für 32 Bestimmungen

- | | | |
|--|-----------|-------------|
| 1. IgG- bzw. IgA-Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprützten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | 1x | 32 Streifen |
| 2. IgG bzw. IgA Cut off Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt | 1x | 1,0 ml |
| 3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel | 2x | 50 ml |
| 4. IgG- bzw. IgA- Konjugat (100x konz.)
Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig | 1x | 57 ml |
| 6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse | 1x | 1 Stk. |

4.2 Kit für 96 Bestimmungen

- | | | |
|---|-----------|-------------|
| 1. IgG bzw. IgA Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprützten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | 3x | 32 Streifen |
| 2. IgG bzw. IgA Cut off Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt | 2x | 1,0 ml |
| 3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel | 4x | 50 ml |
| 4. IgG- bzw. IgA- Konjugat (100x konz.)
Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig | 3x | 57 ml |
| 6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse | 3x | 1 Stk. |

Auf Anfrage zusätzlich erhältlich:

IgG bzw. IgA-Positive Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.
Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikat entnehmen.
(Best.-Nr.: IgG: WE116P60 bzw. IgA: WE116P40)

IgG/IgA -Negative Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.
Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.
(Best.-Nr.: IgG/IgA: WE116N20)

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

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

- Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
- Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
- Nitrozellulose Teststreifen:** Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblässen der Banden zu vermeiden.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	unverdünnt	+2 bis +8°C	1 Woche
Teststreifen	nach Öffnen	+2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel)	3 Monate
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	ca. 6h
Substrat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate

Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	oder Raumtemperatur	2 Wochen

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 Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
4. Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Inkubationswanne (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
2. Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
3. Eine Spritzflasche zum Abstopfen
4. Pipette oder Handwaschgerät
5. Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
6. Pipettenspitzen
7. Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
8. Plastikpinzette
9. Aqua dest. oder deionisiert
10. Filterpapier

8. Untersuchungsmaterial

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

9. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

9.1 Vorbereitung der Proben

1. Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum oder Plasma benötigt.
2. Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma). Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
4. Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
5. Getrübte Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

9.2 Vorbereitung der Reagenzien

1. Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.
2. Vor Verdünnung aller Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
3. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
4. **Verdünnungs-/Waschpuffer**
Der Verdünnungs-/ Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/ Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen.
Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/ Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/ Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.
5. **IgG bzw. -IgA-Konjugat**
Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: Ätestablaufschemaf).
Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.
6. **Substratlösung**
Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

9.3 Immunoblot Testdurchführung

Achtung: Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des B. pertussis + CatACT LINE, muß bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

Für eine sichere Bordetella pertussis Diagnostik sollte der LINE im IgG und IgA durchgeführt werden.

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.
5. Je **15µl Patientenserum/-plasma** bzw. **100µl der Cut off / Positiven / Negativen Kontrolle** zupipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum und Kontrolle **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.
7. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrtes die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.
11. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.

12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.
14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.
15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Streifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtert Ihnen die Auswertung der Patientenproben.

Testablaufschema siehe letzte Seite

9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

10. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control):

Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.

2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control):

Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.

Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

10.1 Auswertung der Patientenproben

Die Position und Bezeichnung der reaktiven Banden entnehmen Sie bitte dem Protokollblatt.

IgG und IgA-Banden: FHA, CatACT, PT

10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle

Die Intensität der PT-Bande der Cut off Kontrolle dient der semiquantitativen Beurteilung aller auftretenden Banden:

Auftretende Banden	Bewertung der Bandenintensitäten
> Cut Off Bande (PT)	positiv (+)
= Cut Off Bande (PT)	grenzwertig (+/-)
< Cut-Off Bande (PT)	negativ (-)

10.3 Bedeutung der Antigene

Auflistung der verwendeten, gereinigten (natives PT und FHA) und rekombinanten (CatACT) *Bordetella pertussis*- Antigene, die aus dem Stamm: Tohama Phase I stammen.

Antigen / Bezeichnung	Bedeutung der Antigene	Spezifität der Antikörper im LINE
PT 28kDa	Pertussis-Toxin (PT) ist ein Exotoxin, das nur bei <i>B. pertussis</i> vorkommt und ist deshalb hochspezifisch für diesen Erreger ist. Es besteht aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit (Subunit S1) und einer rezeptorbindenden B-Untereinheit. Bestandteil des azellulären Impfstoffs und Antikörper gegen PT in Impfsenen zeigen die höchste Korrelation mit einem Schutz gegen eine <i>B. pertussis</i> -Infektion. Für die	Hochspezifisch für <i>B. pertussis</i>

	Bordetella-Diagnostik im IgG via eines Einzelserums stellt das PT das Antigen mit der höchsten Sensitivität und Spezifität von je >98% dar. Das Pertussis-Toxin kann deshalb als Markerprotein einer <i>B. pertussis</i> -Infektion bezeichnet werden. Im IgA und IgM liegt die Antikörper-Antwort gegen PT nur bei etwa 40-50% der Pertussis-Fälle vor (4, 5).	
CatACT 43kDa	Adenylat-Cyclase-Toxin (ACT) ist ein Antigen, das nicht im <i>B. pertussis</i> Impfstoffen vorkommt. Es ist ein essentieller Virulenz-Faktor von <i>B. pertussis</i> (6) Die Kreuzreaktivität des Gesamt-ACT-Proteins mit Mitgliedern der RTX-Toxin-Familie - einschließlich des Hämolsins von <i>E.coli</i> (7, 8, 9,10) - denen jedoch die enzymatische Einheit der Adenylat-Cyclase fehlt ist allgemein bekannt. Aus diesem Grund verwendet der <i>B. pertussis</i> + CatACT LINE nur den N-terminalen, 400 AS langen Anteil des ACT-Antigens (als CatACT bezeichnet), der die katalytische Domäne, die für <i>Bordetella sp.</i> spezifisch ist, beinhaltet. Die CatACT ist für IgG der beste Infektionsmarker für die serologische Diagnostik, der nicht durch den Impfstatus beeinflusst wird. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren 68,0% der kultur-positiven Patienten im IgG seropositiv für CatACT. Es hat sich gezeigt, dass CatACT nach PT der zweit-sensitivste Marker ist. (11) Daher legt der gleichzeitige Nachweis von Antikörpern gegen CatACT und PT das Vorhandensein einer akuten oder kürzlich durchgemachten Infektion nahe.	Spezifisch für <i>Bordetella sp.</i>
FHA 220kDa	Filamentöses Hämagglutinin (FHA) ist ein Oberflächenprotein von <i>Bordetella pertussis</i> . Es dient dem Erreger als wichtiges Adhäsion (4). Die Antikörperantwort auf FHA ist besonders im IgG mit etwa 80-90% sehr hoch; im IgA und IgM liegt sie bei etwa 50-60% (4, 5). Inzwischen konnte aufgrund mehrerer unabhängiger Studien (3, 12, 13) gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktivität des FHA von <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> u. a. bakteriellen Erregern vorhanden ist.	Weniger spezifisch

10.4 Auswertungskriterien

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

Empfohlene IgG und IgA-Beurteilung

PT	CatACT	Bedeutung	Interpretation <i>B. pertussis</i>
-	- +/- +	Kein Hinweis auf eine <i>Bordetella pertussis</i> Infektion. Möglicher Hinweis auf eine <i>B. parapertussis</i> Infektion (siehe unten)	negativ
+/-	- +/- +	Die Möglichkeit einer sehr frühen oder schon länger zurückliegenden <i>B. pertussis</i> Infektion kann gegeben sein. Die Überprüfung mittels eines Zweitserums wird empfohlen.	grenzwertig
+	-	Hinweis auf eine frische oder kürzlich durchgemachte <i>Bordetella pertussis</i> Infektion. Impfstatus überprüfen.	positiv
+	+/- +	Deutlicher Hinweis auf eine frische oder kürzlich durchgemachte <i>Bordetella pertussis</i> Infektion.	

Zusätzlicher Hinweis für eine *B. parapertussis* Infektion im IgG und IgA:

PT	CatACT	FHA	Bedeutung	Interpretation <i>B. pertussis</i>
-	+/-	+	möglicher Hinweis auf eine	negativ

	+		<i>B. parapertussis</i> Infektion	
--	---	--	-----------------------------------	--

Ein CatACT und FHA positives Ergebnis kann bei fehlender PT-Antwort als Hinweis auf eine *B. parapertussis* Infektion interpretiert werden.

Um den Verdacht einer *B. parapertussis* Infektion zu bestätigen, empfehlen wir 7 Tage später ein Zweitserum zu testen; dabei dürfen weiterhin keine Antikörper gegen PT nachweisbar sein. Alternativ kann ein PCR für *B. parapertussis* durchgeführt werden.

FHA-Bande: Das alleinige Auftreten von Antikörpern gegen das unspezifische Gruppenantigen FHA erlaubt keine Aussage, ob es sich um eine Infektion durch *Bordetella pertussis* oder *Bordetella parapertussis* handelt. Hier könnte es sich auch um eine Kreuzreaktion des FHA mit *Haemophilus influenzae* oder anderen Erregern, oder um persistierende Antikörper (Impfantikörper oder Antikörper einer zurückliegenden Infektion) handeln.

Bei Fragestellungen bezüglich serologischer Bordetella-Ergebnisse, die das FHA berücksichtigen, kann auch die FHA-Bande des LINE ausgewertet werden, siehe *B. parapertussis*. Dafür wird die FHA-Bande über die Intensität der PT-Bande der Cut off Kontrolle beurteilt:

> Cut off: positiv / = Cut off: grenzwertig / < Cut off: negativ

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

10.5 Grenzen des Tests

1. Ein negatives Blotergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit *Bordetella pertussis* nicht vollständig aus. Die Probe kann vor Auftreten der Antikörper entnommen worden sein oder der Antikörpertiter liegt unter der Nachweisgrenze des Tests.
2. Durch ein dauerhaftes Vorhandensein oder Fehlen von Antikörpern kann nicht auf Erfolg bzw. Misserfolg einer Therapie geschlossen werden.
3. Aufgrund mehrerer unabhängiger Studien konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktivität des FHA von *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* und anderen Erregern vorhanden ist (3, 12, 13, 21).
4. In seltenen Fällen können Patientenseren färbereiche Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblot ist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

11. Leistungsdaten

11.1 Sensitivität und Spezifität

Als Referenzmethode wurde ein Pertussis Toxin ELISA zur Berechnung der Leistungsdaten (Sensitivität und Spezifität im IgG und IgA) des VIROTECH B. pertussis + CatACT LINE herangezogen.

Es wurden 264 Seren im IgG getestet. Serenkollektive: Blutspender (n=78), Impfsereen (n=14), Seren mit Verdacht auf *Bordetella pertussis* Infektionen (n=119), *Mycoplasma pneumoniae* Seren (n=24), und kreuzreaktive Seren (n=24). 5 getestete Seren konnten keinem Panel zugeordnet werden.

IgG

(n=264)		B. pertussis + CatACT LINE IgG		
		Negativ	Grenzwertig	Positiv
Pertussis Toxin ELISA	Negativ	144	13	1
	Grenzwertig	4	3	1
	Positiv	3	8	87

Grenzwertige Ergebnisse gehen nicht mit in die Berechnung ein.

In Bezug auf den Befund errechnet sich im IgG eine Sensitivität von 96,7 % und eine Spezifität von 99,3 %.

Es wurden 272 Seren im IgA getestet. Serenkollektive: Blutspender (n=82), Impfsenen (n=14), Seren mit Verdacht auf Bordetella pertussis Infektionen (n=121), Mycoplasma Seren (n=27), und Kreuzreaktive Seren (n=24). 4 getestete Seren konnten keinem Panel zugeordnet werden.

IgA

(n=272)		B. pertussis + CatACT LINE IgA		
		Negativ	Grenzwertig	Positiv
Pertussis Toxin ELISA	Negativ	204	5	6
	Grenzwertig	3	2	5
	Positiv	6	3	38

Grenzwertige Ergebnisse gehen nicht mit in die Berechnung ein.

In Bezug auf den Befund errechnet sich im IgA eine Sensitivität von 86,4 % und eine Spezifität von 97,1 %.

11.2 Kreuzreaktivität

Zur Überprüfung eventueller Kreuzreaktionen des VIROTECH B. pertussis + CatACT LINE IgG/IgA mit respiratorischen Erkrankungen wurden 109 bzw. 111 Seren mit Verdacht auf Mycoplasma- oder Chlamydia-Infektionen getestet.

	IgG	IgA
Negativ	91	106
Grenzwertig	10	2
Positiv	8	3

Der VIROTECH B. pertussis + CatACT LINE ist zum differentialdiagnostischen Einsatz hervorragend geeignet.

11.3 Durchseuchung (Erwartete Werte)

Die Cut off-Einstellung ist so gewählt, dass idealerweise nur frische Infektionen und solche mit hohen Impftitern detektiert werden. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von 80 Blutbankseren:

	IgG	IgA
Negativ	71	78
Grenzwertig	6	2
Positiv	3	0

11.4 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)

Bei jeder Chargenfreigabe wird in der Qualitätskontrolle von jedem einzelnen Immunoblot ein Streifen mit einem bestimmten Humanserum im IgG und IgA getestet. Es findet somit eine 100% Kontrolle aller Immunoblots statt.

Die Intensitäten der Banden dürfen bei einer Skala von 1-5 maximal eine Intensitätsstufe vom Mittelwert abweichen.

11.5 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Die Bestimmung der Testpräzision erfolgte in 10 unabhängigen Testansätzen mittels manueller Testung und Automatentestung von unterschiedlichen Personen.

Es wurde ein negatives Serum, ein grenzwertiges Serum und ein positives Serum im IgG und IgA LINE getestet:

	IgG
Negativ	10
Grenzwertig	10
Positiv	10

	IgA
Negativ	10
schwach Positiv	8 / (2*)
Positiv	10

(*) Das schwach positive Serum im IgA wurde 2 x grenzwertig bewertet.

11.6 Impfantikörper

Seit einigen Jahren werden bei den meisten Bordetella Impfprogrammen azelluläre Impfstoffe eingesetzt, die im Wesentlichen die Wirkstoffe FHA und Pertussis-Toxin beinhalten. Bei der IgG-Immunantwort auf die Impfung kann bei vielen Impfungen beobachtet werden, dass Antikörper gegen FHA und PT gebildet werden, diese jedoch schnell wieder abnehmen. Bereits nach 1 Jahr entspricht der Titer meist wieder dem Niveau vor der Impfung (18).

Bei der IgA Immunantwort ist mehrfach beschrieben, dass sie bei Kleinkindern kaum zu finden ist und erst nach einer Infektion gebildet wird (1).

12. zusätzliche Leistungsdaten für die CatACT Bande im IgG

12.1 Sensitivität und Spezifität der CatACT Bande im IgG

Sensitivität

Es wurden 34 Seren aus Bordetella Referenzzentren auf dem B.pertussis + CatACT LINE im IgG getestet. Davon zeigten 23 Seren eine positive CatACT Bande. Dies entspricht einer Sensitivität von 67,6%.

Spezifität

Es wurden Blutspenderseren (n=76) und Impfsenen (n=14) auf dem B.pertussis + CatACT LINE im IgG getestet. Davon zeigten 12 Seren eine positive CatACT Bande. Dies entspricht einer Spezifität von 86,2%.

Da IgA Antikörper ein weniger verlässlicher Marker für *Bordetella sp.* Infektionen sind, wird keine Sensitivität und Spezifität der CatACT Bande im IgA angegeben.

13. zusätzliche Leistungsdaten für *Bordetella parapertussis* im IgG und IgA

13.1 Sensitivität und Spezifität für *Bordetella parapertussis*

Sensitivität

Bei 136 Seren mit Verdacht auf eine B. pertussis Infektion betrug die Anzahl der *B. parapertussis* positiven Seren für IgG 5,1% und für IgA 6,6%. Dies entspricht den Angaben in der Literatur (19, 20).

Spezifität

Es wurden 79 Blutspender im IgG und IgA getestet. Dabei wurde eine Spezifität von 97,2% bzw. von 100,0% erzielt.

14. Literatur

1. Wirsing von König et al., 1999, Evaluation of a single-Sample Serological Technique for Diagnosing Pertussis in Unvaccinated Children, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, (18)341-345.
2. Wiersbitzky, S., Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt, Therapiewoche 25 (1995), S.1485 - 1486.
3. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259.
4. Tiller, F-W.; Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, Apr,1997.
5. Bruce D. Meade, Chrisanna M. Mink, and Charles R. Manclark. 1994. Serodiagnosis of Pertussis, Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.
6. Weingart, C. L., and A. A. Weiss. 2000. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. Infect. Immun. 68:1735-1739.

7. Arciniega, J. L., E. L. Hewlett, K. M. Edwards, and D. L. Burns. 1993. Antibodies to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in neonatal and maternal sera. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 6:325-330.
8. Carlsson et al., Nov 1999, Acquisition of serum antibodies against filamentous hemagglutinin and pertactin unrelated to *Bordetella pertussis* infection., Clin Microbiol Infect.,(5)709-712.
9. Bauer, M. E., and R. A. Welch. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. 64:167-175.
10. Chart, H., S. M. Scotland, and B. Rowe. 1989. Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157:H7 in patients with hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 27:285-290.
11. Lee, S. J., M. C. Gray, L. Guo, P. Sebo, and E. L. Hewlett. 1999. Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Infect. Immun. 67:2090-2095.
12. Alison A. Weiss et al, Characterization of Serological Responses to Pertussis, CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Mar.2006, p341-348.
13. Bergfors et al., Juli 1999, Parapertussis and Pertussis: Differences and Similarities in Incidence, Clinical course, and Antibody Responses, Int J Infect Dis, 3(3):140-146.
14. Carlsson et al., Nov 1999, Acquisition of serum antibodies against filamentous hemagglutinin and pertactin unrelated to *Bordetella pertussis* infection., Clin Microbiol Infect.,(5)709-712.
15. Epidemiologisches Bulletin, 1/9: 1-4, Robert Koch Institut (RKI), Populationsimmunität gegen Diphtherie und Pertussis.
16. Hallander, Microbiological and Serological Diagnosis of Pertussis, Clinical Infectious Diseases 1999;28 (Suppl.2):99-106.
17. 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.
18. Watanabe, M., B. Connelly, and A. A. Weiss. 2006. Characterization of serological responses to pertussis. Clinical and vaccine immunology 13:341-8.
19. Weston, W., M. Messier, L. R. Friedland, X. Wu, and B. Howe. 2011. Persistence of antibodies 3 years after booster vaccination of adults with combined acellular pertussis, diphtheria and tetanus toxoids vaccine. Vaccine. Elsevier Ltd 29:8483-6.
20. Dragsted, D. M., B. Dohn, J. Madsen, and J. S. Jensen. 2004. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. Journal of medical microbiology 53:749-54.
21. Hallander, H. O., J. Gnarpe, H. Gnarpe, and P. Olin. 1999. *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and persistent cough in children. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 31:281-286.
22. Baughman, A. L., K. M. Bisgard, K. M. Edwards, D. Guris, M. D. Decker, K. Holland, B. D. Meade, and F. Lynn. 2004. Establishment of Diagnostic Cutoff Points for Levels of Serum Antibodies to Pertussis Toxin, Filamentous Hemagglutinin, and Fimbriae in Adolescents and Adults in the United States. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11:1045-1053.

15. Testablaufschemata

Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	30 Minuten	15 µl Patientenserum/-plasma / 100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Waschen	3 x 5 Minuten	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	30 Minuten	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100)
Waschen	3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	10 ± 3 Minuten	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	3 x ohne Zwischeninkubation	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

Anzahl Streifen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnungs/ Waschpuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugat-Konzentrat	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Endvolumen	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Anzahl Streifen	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Verdünnungs/ Waschpuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugat-Konzentrat	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Endvolumen	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Anzahl Streifen	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Verdünnungs/ Waschpuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugat-Konzentrat	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Endvolumen	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Anzahl Streifen	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Verdünnungs/ Waschpuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugat-Konzentrat	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Endvolumen	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml