



## Gebrauchsinformation für ELIMMUN-Pertussis M

Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern  
gegen B. pertussis im Serum  
Best.-Nr.: EP-300  
Ausgabe: 2004-04

### Diagnostische Bedeutung

Keuchhusten ist eine ernste, zeitweise epidemische Infektionskrankheit, die vorwiegend Kleinkinder betrifft. Komplikationen durch Lungenentzündungen und Todesfälle gibt es hauptsächlich bei Säuglingen.

Im typischen Fall verläuft die Erkrankung nach ein- bis zweiwöchiger Inkubationszeit in drei Phasen. Dem 1 - 2 Wochen dauernden Stadium catarrhale mit unspezifischen Symptomen folgt für drei bis sechs Wochen das Stadium convulsivum mit charakteristischen krampfartigen Hustenanfällen und schließlich das Stadium decrementi mit abklingenden Symptomen, das bis zu sechs Monaten anhalten kann.

Der Keuchhusten ist global verbreitet und hochinfektiös, die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt durch Tröpfcheninfektion, Ansteckungsfähigkeit besteht bis zu sechs Wochen.

Der Krankheitserreger ist Bordetella pertussis, ein aerobes, kokkoides gramnegatives Stäbchenbakterium. Es besiedelt das zilienträgende Epithel der Atemwegsschleimhäute. Das Krankheitsbild entsteht durch die kombinierte Wirkung verschiedener Virulenzfaktoren (1). Immunogene Adhäsine wie filamentöses Hämagglutinin, Pertactin und Fimbrien ermöglichen die Anheftung an die Zilien. Daneben produziert B.pertussis eine Reihe von Toxinen, darunter Pertussistoxin, Trachea-Zytotoxin, hitzelabiles Toxin und Adenylatzyklase-Toxin. Die Toxine schwächen die lokalen Abwehrkräfte und schädigen das Gewebe.

Seit Kombinationsimpfstoffe mit der azellulären Pertussis-Komponente eingesetzt werden, ist die Erkrankungsrate gesunken. Da aber weder Impfung noch Infektion eine lebenslange Immunität gewährleisten, erkranken auch Jugendliche und Erwachsene und stellen eine wichtige Infektionsquelle dar (RKI, Cromer...). Der atypische Krankheitsverlauf bei diesen Personen bereitet oft diagnostische Schwierigkeiten.

Während für die Frühdiagnostik ein Erregernachweis erforderlich ist, ist zur Klärung des Immunstatus bei lang anhaltenden atypischen Infekten sowie nach Impfungen der ELISA die Methode der Wahl (4). Die Antikörperbildung beginnt frühestens beim Übergang in das Stadium convulsivum, mit einem schnellen Anstieg von IgA und IgM Antikörpern, gefolgt von IgG- Antikörpern.

Der ELIMMUN Pertussis verwendet zwei gereinigte Antigene-Pertussus-Toxin und Filament-Hämagglutinin. Damit wird der Nachweis spezifischer Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen ermöglicht und eine hohe Spezifität und Sensitivität gewährleistet (5). Beide Antigene sind auch Komponenten des Impfstoffes, deswegen eignet sich der ELIMMUN-Pertussis gut zur Impfkontrolle (6).

## Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem Pertussis-Toxin (PT) und Filament Hämagglutinin (FHA) beschichtet. Verdünnte Patientenserum und Kontrollserum werden in den Mikroröhrchen inkubiert und bilden im Verlauf der Inkubation einen Antigen-Antikörperkomplex mit dem immobilisierten PT und FHA. Nicht gebundene Proteine werden durch Absaugen und Waschen entfernt. Im zweiten Inkubationsschritt bindet Peroxidase-markiertes Anti-human-IgM-Konjugat an die vorhandenen Immunkomplexe. Ungebundenes Konjugat wird durch Absaugen und Waschen entfernt. Die Peroxidase-Enzymaktivität wird durch Umsetzung des Substrates gemessen, die durch einen Farbumschlag von rosa nach blau, nach dem Abstoppen mit Schwefelsäure von blau nach gelb angezeigt wird. Diese Färbung kann in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm oder 450 / 630 nm gemessen werden.

## Gefahrenhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Bestandteile menschlichen Blutes, die für diesen Kit verwendet werden, stammen von Spendern, deren Blut individuell auf HIV-Antikörper, HB<sub>s</sub>Ag und Anti-HCV untersucht und als nicht reaktiv befunden wurden.

Da durch keine derzeit bekannten Testmethoden das Vorhandensein von Hepatitis B-, Hepatitis-C-Viren und HIV oder anderer infektiöser Erreger mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, sollten Blut, Blutbestandteile und virale Antigene grundsätzlich als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt und entsorgt werden.

Stoppreagenz vorsichtig handhaben – verursacht schwere Verätzungen! Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich auswaschen und Arzt konsultieren. Niemals Wasser hinzugießen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

## Inhalt und Zusammensetzung der Testpackung

Mit Pertussis-Toxin und Filament Hämagglutinin beschichtete Mikrotiterplatte 12 brechbare Riegel im Halterahmen, gebrauchsfertig	96 Einzelnapfchen
Cut-off-Serum (Humanserum mit Albumin und antimikrobiellem Wirkstoff)	1 x 0,1 ml-Fläschchen
Negatives Kontrollserum (Humanserum mit Albumin und antimikrobiellem Wirkstoff)	1 x 0,1 ml-Fläschchen
Konjugat, gebrauchsfertig Meerrettich-Peroxidase-markiertes anti-human-IgM (Ziege) in Puffer mit antimikrobiellem Wirkstoff	1 x 16 ml-Fläschchen
Serumverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	3 x 50 ml-Fläschchen
Waschpufferkonzentrat (10fach)	2 x 50 ml-Fläschchen
Substrat Tetramethylbenzidin in Puffer mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , gebrauchsfertig	1 x 12 ml-Fläschchen
Stoppreagenz 2,5 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig	1 x 12 ml-Fläschchen
Klebestreifen	24 Stück

## Zusätzlich erforderliches Material

Mikrotiterplattenphotometer mit Filtern 450 nm oder 450 / 630 nm

Brutschrank mit 37 °C

Manuelle oder automatische Waschanlage

Mikropipetten mit Einmalspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Vortexmischer

Röhrchen zur Probenverdünnung

Aqua dest.

Messzylinder

## Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

**Lagerung: bei + 2 °C bis + 8 °C unter Vermeidung starker Lichteinwirkung.**

Das Verfalldatum der Testpackung befindet sich auf der Außen-Verpackung. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind auf den jeweiligen Etiketten angegeben.

## Haltbarkeit nach Öffnen

Die Haltbarkeit nach erstmaligem Öffnen ist auf dem Etikett der einzelnen Reagenzien angegeben.

Ansonsten ist für geöffnete Packungen zu beachten:

Beschichtete Mikrotiterplatte	Nicht benutzte Nöpfchen wieder dicht im Beutel verschließen und bei + 2 °C bis + 8 °C lagern.
Cut-off Serum	Verdünntes Cut-off Serum am selben Tag verbrauchen!
Negatives Kontrollserum	Verdünntes Serum am selben Tag verbrauchen!
Waschpufferkonzentrat	Angesetzter Puffer ist bei + 2 °C bis + 8 °C zwei Wochen haltbar. Eventuelle Ausfällungen im Konzentrat können durch Erwärmen auf 37 °C gelöst werden.

## Probenmaterial

Im ELIMMUN-Pertussis M kann Serum untersucht werden. Hämolytische, kontaminierte oder Proben, die Partikel enthalten, sind für den Test nicht geeignet.

Die Proben können bei + 2 °C bis + 8 °C bis zu 5 Tagen oder bei - 20 °C für längere Zeit gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

## Vorbereitung der Proben und Reagenzien

Vor dem Test müssen folgende Verdünnungen angesetzt werden:

Waschpufferkonzentrat	<b>1:10</b> mit Aqua dest. verdünnen (z. B. 50 ml + 450 ml Aqua dest.)
Alle Serumproben	<b>1:101</b> mit Serumverdünnungspuffer verdünnen (10 µl + 1,0 ml Puffer)
Cut-off Serum	
Negatives Kontrollserum	

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Reagenzien aus verschiedenen Testpackungs-Chargen können nicht ausgetauscht werden.

## Testdurchführung

Alle Reagenzien vor Gebrauch ca. 30 min bei Raumtemperatur (+ 20 °C bis + 25 °C) stehen lassen.

Proben und Reagenzien vor Verwendung sorgfältig schütteln. Beim Öffnen der Reagenzienflaschen und bei Entnahme der Reagenzien mikrobielle Kontamination vermeiden. Proben können in Einzelbestimmung gemessen werden. Das Cut-off-Serum und das negative Kontrollserum müssen bei jedem Ansatz mitgetestet werden. Eine freie Vertiefung für die Berechnung des Blank-Wertes vorsehen.

## Pipettierschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Probe 5										
B	neg. KS	Probe 6										
C	Cut-off Serum	↓										
D	Cut-off Serum	↓										
E	Probe 1	↓										
F	Probe 2											
G	Probe 3											
H	Probe 4											

1. Je 100 µl Serumprobe, negatives Kontrollserum und Cut-off-Serum (alle bereits 1:101 verdünnt) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Platte abkleben und 1 Stunde (± 5 min) bei 37 °C inkubieren.
3. Platte 4 x mit je 350 - 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen, absaugen und zuletzt ausklopfen.
4. Je 100 µl Konjugat (gebrauchsfertig) pro Vertiefung pipettieren.
5. Platte abkleben und 30 min bei 37 °C inkubieren.
6. Platte 4 x mit je 350 - 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen, absaugen und zuletzt ausklopfen.
7. Je 100 µl Substrat pro Vertiefung pipettieren.
8. Platte abkleben und exakt 10 min bei Raumtemperatur (+ 18 °C bis + 25 °C) vor intensivem Licht geschützt inkubieren.
9. In alle Vertiefungen je 100 µl Stoppreagenz in der Reihenfolge wie bei der Substratzugabe pipettieren.
10. Die Extinktion der Lösungen jeder Vertiefung bei 450 nm oder 450 / 630 nm messen. Die Messung sollte innerhalb 1 Stunde nach Stoppreagenzzugabe erfolgen.

## Testauswertung

Sofern vom Photometer nicht automatisch die Extinktion des Blankwertes von den Extinktionen der Standardseren und Patientenseren abgezogen wird, den Abgleich manuell durchführen.

## Testgültigkeitskriterien

Die Extinktion des negativen Kontrollserums muss kleiner als 0,200 sein.

Das Verhältnis zwischen Extinktion des Cut-Off-Serums und der Extinktion des negativen Kontrollserums muss größer als 2,0 sein.

$$\frac{\text{Extinktion Cut-Off-Serum}}{\text{Extinktion neg. Kontrollserum}} > 2,0$$

Treffen diese Annahmekriterien nicht zu, muss die Bestimmung wiederholt werden.

## Qualitative Auswertung

Patientenseren, deren Extinktion mehr als 10 % über der Extinktion des Cut-off-Serums liegt, sind als positiv zu betrachten. Patientenseren, deren Extinktion mehr als 10 % unter der Extinktion des Cut-off-Serums liegt, werden als negativ betrachtet. Patientenseren mit Extinktion  $\pm 10$  des Cut-off-Serums sind grenzwertig und können nicht klar bewertet werden.

Zur Überprüfung sollten diese grenzwertigen Seren wiederholt werden oder auf B. pertussis IgG-Antikörper untersucht werden.

## Quantitative Auswertung

Quantitative Ergebnisse für die Patientenseren werden wie folgt berechnet:

$$\text{Ergebnis} = \frac{\text{Extinktion Patientenprobe}}{\text{Extinktion Cut-off-Serum}}$$

## Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben, die bei der quantitativen Ergebnisberechnung einen Wert von  $\geq 1,1$  erreichen, sind positiv. Zur Abklärung einer akuten Infektion sollte zusätzlich noch auf B. pertussis IgG-Antikörper untersucht werden.

Patientenproben mit einem Wert von  $\leq 0,9$  sind negativ. Ergebnisse zwischen 0,9 und 1,1 sind grenzwertig. Die entsprechenden Seren sollten zur Abklärung nochmals wiederholt und auf B. pertussis IgG-Antikörper untersucht werden. Darüber hinaus ist es ratsam, eine zweite Probe im Abstand von ca. 14 Tagen abzunehmen. Ein Anstieg der zweiten Probe um mehr als 25 % ist signifikant und weist auf eine akute Infektion hin.

## Leistungsmerkmale des Tests

### Spezifität und Sensitivität

Insgesamt 36 Seren wurden im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen ELISA untersucht. Daraus ergab sich für den ELIMMUN-Pertussis M:

Spezifität:	76,9 %
Sensitivität:	95,7 %
Vorhersagewert:	88,0 %

Von den 36 Seren wurden 27 = 75,0 % richtig bestimmt.

## Präzision

**Interassay:** Sechs Seren unterschiedlicher Reaktivität wurden in sieben unabhängig voneinander geführten Ansätzen untersucht.

	A	B	C	D	E	F
Mittlere Extinktion (OD)	0,021	0,642	0,705	0,918	1,040	1,588
Standardabweichung	0,002	0,018	0,015	0,014	0,015	0,027
Variationskoeffizient %	9,042	2,745	2,198	1,555	1,441	1,712
Anzahl der Messungen	7	7	7	7	7	7

**Intraassay:** Fünf Seren unterschiedlicher Reaktivität wurden im Mehrfachansatz innerhalb einer antigenbeschichteten Platte getestet.

	G	J	K	L	M
Mittlere Extinktion (OD)	0,596	0,765	0,903	0,978	1,567
Standardabweichung	0,039	0,038	0,068	0,051	0,089
Variationskoeffizient %	6,570	4,967	7,510	5,263	5,680
Anzahl der Messungen	48	48	48	48	48

## Grenzen des Verfahrens

Eine endgültige klinische Diagnose darf nicht auf den Resultaten einer einzelnen diagnostischen Methode erstellt werden. Der Arzt muss die Anamnese und alle klinischen und Laborbefunde des Patienten berücksichtigen.

Mikrobielle Kontamination oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben kann die Messergebnisse verfälschen.

## Literatur

- 1) Tiller, F.-W. (1997): Diagnostische Bibliothek - Bordetella Pertussis. Laboratoriums Medizin 1997, 47, 1 – 12
- 2) RKI: Ratgeber für Infektionskrankheiten. 28. Folge: Pertussis. Epidemiologisches Bulletin 43/2001, 328 - 331
- 3) Cromer, B. A., Goydos, J., Hackell J., Mezzatesta, J., Dekker, C., Mortimer, E. A.: Unrecognized Pertussis Infection in Adolescents (1993). AJDC – Vol 147, 575 – 577
- 4) Ringler, M., Göbel, G., Möst, J., Weithaler, K. (2003): Fully vaccinated children are rare: Immunization coverage and seroprevalence in Austrian school children. Eur. J. of Epidemiology 18, 161 – 170
- 5) Granstöm, G., Wretling, B., Salenstedt, C.-R-, Granström, M (1988): Evaluation of serologic assay for diagnosis of whooping cough. J. Clin. Microbiol. 1988, 26 (9), 1818 - 1823
- 6) Edwards, K. M. et al, Comparison of 13 Acellular Pertussis Vaccines: Overview and Serologic Response, Pediatrics Supplement (Sept. 1995): 548 – 557

## Kurzanleitung

Patientenproben, negatives Kontrollserum, Cut-off-Serum  
1:101 verdünnen



Proben, negatives Kontrollserum und Cut-off-Serum  
100µl / Vertiefung



Inkubation 60 min, 37 °C



waschen



Konjugat, gebrauchsfertig  
100 µl / Vertiefung



Inkubation 30 min, 37 °C



waschen



Substrat  
100 µl / Vertiefung



Inkubation 10 min, Raumtemperatur



Stoppreagenz  
100 µl / Vertiefung



Extinktionsmessung bei 450 nm oder 450 / 630 nm