



## Gebrauchsinformation für ELIMMUN-Pertussis G

Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern  
gegen B. pertussis im Serum  
Best.-Nr.: EP-400  
Ausgabe: 2008-01

### 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-Pertussis-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 Patientenseren und Kontrollseren 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-IgG-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, Etikett des Stoppreagenz vorzeigen).

## Inhalt und Zusammensetzung der Testpackung

Mit Pertussis-Toxin und Filament Hämagglutinin beschichtete Mikrotiterplatte 12 brechbare Riegel im Halterahmen, gebrauchsfertig	96 Einzelnöpfchen
Calibratoren 1 – 4, gebrauchsfertig Anti-B. Pertussis IgG-Standards (Humanserum mit Albumin und antimikrobiellem Wirkstoff) Die Calibratoren enthalten ca. 2, 10, 30 und 50 U/ml; genaue Konzentrationen für diese Testpackung sind auf beiliegendem Datenblatt angegeben	4 x 1,2 ml-Fläschchen
Negatives Kontrollserum, gebrauchsfertig (Humanserum mit Albumin und antimikrobiellem Wirkstoff)	1 x 1,2 ml-Fläschchen
Positives Kontrollserum, gebrauchsfertig (Humanserum mit Albumin und antimikrobiellem Wirkstoff)	1 x 1,2 ml-Fläschchen
Konjugat, gebrauchsfertig Meerrettich-Peroxidase-markiertes anti-human-IgG (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
Datenblatt	1 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.
Calibrator 1 – 4	Calibratoren bei + 4 °C lagern!
Positives und Negatives Kontrollserum	Serum bei + 4 °C lagern!
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 G 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)

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. Die 4 Calibratoren müssen zum Erstellen einer Standardkurve bei jedem Ansatz mitgetestet werden. Eine freie Vertiefung für die Berechnung des Blank-Wertes vorsehen.

Negatives und positives Kontrollserum sollte bei jedem Testlauf in Einzelbestimmung mitgeführt werden.

## Pipettierschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Probe 2										
B	Cal. 1	Probe 3										
C	Cal. 2	↓										
D	Cal. 3	↓										
E	Cal. 4	↓										
F	Neg. KS											
G	Pos. KS											
H	Probe 1											

1. Je 100 µl Serumprobe, negatives und positives Kontrollserum und Calibratoren in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Platte abkleben und 1 Stunde ( $\pm 5$  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 Calibratoren und Patientenseren abgezogen wird, den Abgleich manuell durchführen.

## Testgültigkeitskriterien

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

Der Wert des positiven Kontrollserums muss größer als 10 U/ml sein.

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

## Quantitative Auswertung

Für die quantitative Auswertung wird anhand der vier Calibratoren eine Standardkurve erstellt.

Die Mittelwerte der Extinktionen aller 4 Calibratoren in Abhängigkeit von der Konzentration an B. Pertussis-IgG-Antikörpern, ausgedrückt in U/ml, auf halblogarithmischem Millimeterpapier abbilden (Beispiel siehe Datenblatt).

Durch Interpolation der Extinktionswerte der Probe auf der Standardkurve ergibt sich das quantitative Ergebnis in U/ml.

## Qualitative Auswertung

Wenn man den Test nur qualitativ mit der Anforderung positiv / negativ auswerten möchte, ist es ausreichend den Calibrator 2 als Standard einzusetzen.

Patientenseren, deren Extinktion mehr als 10 % über der Extinktion des Calibrator 2 (10 U/ml) liegt, sind als IgG-Antikörper-positiv zu betrachten. Patientenseren, deren Extinktion mehr als 10 % unter der Extinktion des Calibrator 2 liegt, werden als negativ betrachtet.

## Interpretation der Ergebnisse

Eine Antikörperkonzentration von mind. 11 U/ml ist ein positives Ergebnis und deutet auf eine früher durchgemachte Infektion hin.

Enthält eine Probe weniger als 10 U/ml bedeutet dies, dass in diesem Serum kein signifikanter Antikörpertiter gegen B. pertussis vorliegt. Es ist davon auszugehen, dass keine Immunität besteht.

Proben mit grenzwertige Ergebnissen ( $\pm 10\%$  um den Cut-off-Wert) sollten zur Bestätigung nochmals getestet werden. Bei Werten zwischen 10 und 20 U/ml müssen nach zwei bis vier Wochen weitere Serumproben entnommen und geprüft werden.

Die Diagnose einer kürzlich erworbenen B.pertussis Infektion sollte nicht nur aufgrund einer Bestimmung von ansteigenden IgG-Antikörpertitern in gepaarten Proben erstellt werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse sollte ein B.pertussis IgM-Test durchgeführt werden.

## Leistungsmerkmale des Tests

### Messbereich

2,0 U/ml – 50 U/ml

Der Cut-off Wert wurde auf 10 U/ml festgelegt.

### Spezifität und Sensitivität

Insgesamt 121 Seren wurden im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen ELISA untersucht. Daraus ergab sich für den ELIMMUN-Pertussis G:

Spezifität: 88,88 %

Sensitivität: 99,10 %

Vorhersagewert: 99,10 %

Von den 121 Seren wurden 119 = 98,35 % richtig bestimmt.

## Präzision

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

	A	B	C	D	E	F
Mittlere Extinktion (OD)	0,042	0,535	1,004	1,073	1,392	1,037
Standardabweichung	0,007	0,036	0,074	0,076	0,102	0,076
Variationskoeffizient %	16,67	6,73	7,37	7,33	7,33	7,33
Anzahl der Messungen	5	5	5	5	5	5

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

	G	J	K	L	M	N
Mittlere Extinktion (OD)	0,562	0,844	1,047	1,265	1,552	1,618
Standardabweichung	0,042	0,054	0,071	0,165	0,189	0,092
Variationskoeffizient %	7,534	6,438	6,784	13,039	12,182	5,656
Anzahl der Messungen	48	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

