

Bordetella pertussis ViraChip® IgG Test Kit 2.0

Gebrauchsanweisung



Chip-Immunoblot zum qualitativen Nachweis von **IgG** Antikörpern gegen spezifische **Bordetella species** Antigene in humanem Serum.

Der **Bordetella pertussis ViraChip® IgG Test Kit 2.0** ist ein Immunoblot auf Basis eines Enzym-Immunoassays im Microarray-Format, bei dem folgende aufgereinigte Bordetella-spezifische Antigene verwendet werden: Filamentöses Hämagglutinin (**FHA**) und Pertussis Toxin (**PT**). Zur Quantifizierung über die ViraChip® Software ist das FHA in zwei und das PT in drei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Somit kann über das PT zwischen einem **kürzlichen Kontakt** mit Bordetella pertussis (einmalig deutlich erhöhter Wert im IgG) und einer **abgelaufenen Infektion** unterschieden werden (12,13).

Die Reaktivitäten aller Antigenspots wurden anhand des *WHO International Standard Pertussis Antiserum (Human) 1st* eingestellt und ermöglichen somit eine Korrelation mit Messwerten in Internationalen Units pro Milliliter (19). Der Bordetella pertussis ViraChip® IgG Test Kit 2.0 ist nach der Richtlinie **98/79/EG** hergestellt.

Testprinzip

Am Boden jeder Kavität einer 96 well Standard-Mikrotiterplatte (MTP) befindet sich eine Nitrozellulose-Membran auf der Antigene als Analytspots fixiert sind (Microarray). Während der Seruminkubation binden Bordetella-spezifische Antikörper im Patientenserum an die fixierten Antigene auf dem Microarray. Während der Konjugatinkubation bindet das Konjugat an den Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Zugabe der Chromogen / Substratlösung setzt die an den Konjugat-Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase das Chromogen / Substrat um und färbt damit den Antigen-Antikörper-Komplex auf dem Microarray lila bis schwarz an. Nach der Seruminkubation, der Konjugatinkubation und der Chromogen / Substratinkubation erfolgt jeweils ein Waschschritt zur Entfernung ungebundener Antikörper und Reagenzien.

Jeder Microarray beinhaltet neben den Analytspots folgende Kontrollspots: **Serumkontrollen, Konjugatkontrollen, Kalibratorkontrollen** und eine **Negativkontrolle**. Die Analytspots dienen dem Nachweis von Antikörpern gegen die Bordetella-spezifischen Antigene **FHA** und **PT**.

Zur eindeutigen Kennzeichnung sind die Kavitäten farblich kodiert: Dazu ist der Bordetella pertussis ViraChip® IgG durch einen **blauen Vollkreis** auf dem Kavitätenrand markiert.

Best.-Nr.: **V-BPCGOK**
 Packungsgröße: **MTP à 96 einzelbrechbaren Kavitäten**
 Probenmaterial: **10 µl Serum**
 Testdauer: **ca. 130 Minuten**

Kitinhalt

1 MTP à 96 Kavitäten	Bordetella pertussis ViraChip® IgG Antigen Coated Wells Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Prod.-Nr.: V-BPCGAC)
12 ml	ViraChip® AP-Anti-Human IgG Conjugate Anti-human IgG Konjugatlösung für ViraChip® Teste, aus Ziege, mit boviner alkalischer Phosphatase, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCGKI)
100 ml	ViraChip® / ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Buffer Waschpuffer-Konzentrat für ViraChip® Teste, mit Detergenzien und Salzen zum Verhindern unspezifischer Bindungen, 10-fach	(Best.-Nr.: V-UVNUWP)
12 ml	ViraChip® Chromogen / Substrate Solution Chromogen/Substratlösung für ViraChip® Teste, mit BCIP / NBT, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVUCUS)

Zusätzlich erforderlicher Puffer für die Probenverdünnung, wird separat mitgeliefert

50 ml	ViraChip® Sample Buffer Probenpuffer für ViraChip® Teste, mit Milchpulver, Detergenzien und Salzen zum Verhindern unspezifischer Bindungen, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVUCUPP)
-------	---	------------------------

Optional erhältlich

1 MTP-Riegel à 8 Kavitäten	Bordetella pertussis ViraChip® IgG Antigen Coated Wells (8) Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-BPCGRT)
330 µl	Bordetella pertussis ViraChip® IgG Positive Control IgG positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-BPCGPK)
330 µl	Bordetella pertussis ViraChip® IgG,A,M Negative Control IgG, IgA, IgM negatives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-BPCPNK)

Zusätzlich geforderte Ausrüstung

1. ViraChip Software®	zum Vorbereiten, Durchführen und Auswerten des Testlaufes, ab v1.3.0-1960	(Best.-Nr.: V-VCNUPR)
2. 2D-Barcode Scanner	zum Lesen der DataMatrix-Codes	
3. Mikrotiterplatte mit 96 Leerkavitäten	zum Auffüllen angefangener Riegel der Mikrotiterplatte im Halterahmen	(Best.-Nr.: V-UVNMTP)
4. Orbitalschüttler (750 rpm) oder Linearschüttler (20 Hz)	zur Durchmischung von Proben und Reagenzien während der Prozessierung	
5. ViraChip® Scanner oder ViraChip® Reader	zur Digitalisierung / Messung entwickelter ViraChip® Teste, ab ViraChip® Scanner v1.0 bzw. ViraChip® Reader Rev.01	(Best.-Nr.: V-UVVCSCA) (Best.-Nr.: V-UVCCAM)
6. Optional: Ventilator/ Lüfter	zur schnelleren Trocknung der entwickelten Mikrotiterplatten	

Vorbereiten der Reagenzien und der Patientenproben

Alle Reagenzien und die verpackte Mikrotiterplatte vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT: 20-23°C) bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch gut durchmischen.

Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung: **Waschpuffer-Konzentrat 1:10** in destilliertem oder deionisiertem Wasser (H₂O) verdünnen: 100 ml Waschpuffer-Konzentrat + 900 ml H₂O

Probenpuffer: Gebrauchsfertig

Bordetella pertussis ViraChip® IgG Test Kit 2.0 - 2 -

Konjugatlösung:	Gebrauchsfertig
Chromogen / Substratlösung:	Gebrauchsfertig
MTP-Kavitäten:	Die Mikrotiterplatte (MTP) vorsichtig aus der Verpackung entnehmen und die benötigte Anzahl an Kavitäten in einen leeren Mikrotiterplattenrahmen stecken (Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes, Punkt 3). Nach Entnahme aus der Verpackung Kavitäten sofort verwenden. Nicht benötigte Kavitäten sofort wieder in die Originalverpackung zurückgeben, dicht verschließen und bei 2-8°C lagern.
Patientenproben:	Die Patientenproben werden in einer 1:380 Verdünnung eingesetzt, z.B. 10 µl Patientenprobe + 3790 µl Probenpuffer . Von der verdünnten Probe werden bei der Prozessierung 100 µl benötigt.
Kontrollen:	Bei Bedarf wird das positive und das negative Kontrollserum in einer 1:80 Verdünnung eingesetzt, z.B.: 10 µl Kontrollserum + 790 µl Probenpuffer . Von der verdünnten Kontrolle werden bei der Prozessierung 100 µl eingesetzt.

Aufbau des Bordetella pertussis ViraChip® IgG Microarrays
Antigene:

Jedes Bordetella-spezifische Antigen, **FHA-1**, **FHA-2**, **PT-1**, **PT-2** und **PT-3**, ist drei Mal in identischer Konzentration als Spottriplett aufgetragen. Jedes Spottriplett entspricht einer Bande im Western Blot / Immunoblot.

Kontrollen:

Jede ViraChip® Kavität enthält folgende integrierten Kontrollen:

Zwei Serumkontrollen (sc), eine Negativkontrolle (nc), zwei IgG Konjugatkontrollen (ccG), zwei IgA Konjugatkontrollen (ccA) und sechs Kalibratorkontrollen (cal).

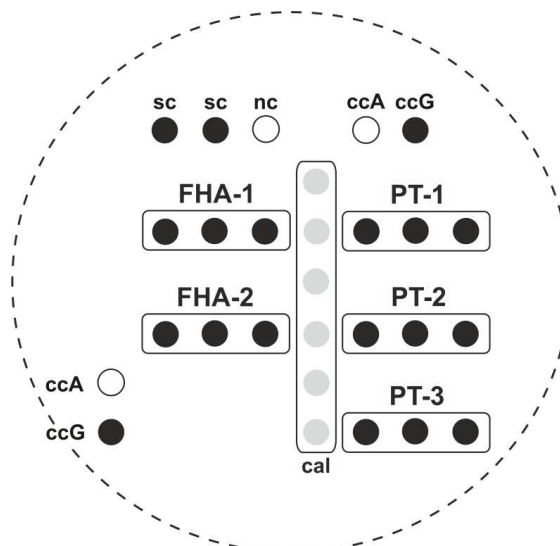


Abbildung 1: Abbildung einer Kavität aus der Mikrotiterplatte mit dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG Microarray (vergrößert). Anordnung der Spottriplets für Antigene und der Spots für integrierte Kontrollen.

Nomenklatur und Beschreibung der Bordetella Antigene aus der Literatur

Antigen:	Bemerkungen:
FHA (220 kD) Filamentöses Hämagglutinin	Spezifisch für Bordetella species: 80-90% der infizierten Patienten bilden IgG Antikörper bzw. 50-60% IgA Antikörper gegen FHA (7). Antikörper gegen FHA werden nach Impfung und nach Infektion mit Bordetella pertussis oder Bordetella parapertussis gebildet.
PT (28 kD) Pertussis Toxin	Hochspezifisch für Bordetella pertussis. Über 90% der infizierten Patienten bilden IgG Antikörper bzw. 40-50% IgA Antikörper gegen PT (7). Antikörper gegen PT werden nach Impfung und Infektion mit Bordetella pertussis, nicht aber nach Bordetella parapertussis Infektion gebildet.

Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes

Bei automatisierter Prozessierung können sich Inkubationszeiten, Volumina und die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte von der im Folgenden aufgeführten Arbeitsvorschrift unterscheiden. Eine detaillierte Schritt-für-Schritt Anleitung für die verwendete Automationslösung sowie eine Anleitung für die Benutzung der ViraChip® Software wird bei der Einrichtung der Geräte und Schulung durch die Viramed Biotech AG zur Verfügung gestellt. Siehe auch Abschnitt „Hinweise zu Geräten und Software“.

1. Belegen

Testauswahl und Eintrag der Probanden in den Belegungsplan der ViraChip® Software.

2. Bestücken

Scannen der 2D-Barcodes auf den Etiketten des Test Kits und der Mikrotiterplatte, zur Übertragung der Chargennummern und der chargen-spezifischen Faktoren (lot specific factors).

3. Prozessieren

Alle Schritte der Prozessierung bei RT durchführen.

3.1 Vorbereitung

- Die gemäß der Belegung definierte Anzahl an Kavitäten in den Halterahmen setzen.
- Leere Positionen eines Riegels der Mikrotiterplatte im Halterahmen mit Leerkavitäten auffüllen. Die Riegel sind auf der Mikrotiterplatte mit 1-12 gekennzeichnet.

Darauf achten, dass beim Brechen der Riegel keine Kunststoffpartikel in die Kavitäten fallen.

3.2 Vorinkubation

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.3 Seruminkubation

- Gemäß dem Belegungsplan 100 µl verdünnte Patientenprobe bzw. 100 µl verdünntes Kontrollserum der entsprechenden Kavität zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.4 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Absaugnadeln so einstellen bzw. Pipetten so verwenden, dass die Kavitätenböden nicht beschädigt werden.

3.5 Konjugatinkubation

- Je Kavität 100 µl Konjugatlösung zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Die Kavitätenböden müssen während der Inkubationsschritte vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.

3.6 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Während der Inkubations- und Waschschriffe einen Orbitalschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 750 rpm, oder einen Linearschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 20 Hz, verwenden.

3.7 1 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- 1 Minute bei RT inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.8 Substratinkubation

- Je Kavität 100 µl Chromogen/Substratlösung zugeben.
- 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Stoppen: Flüssigkeit absaugen.

3.9 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- Keine Zwischeninkubation.
- Flüssigkeit absaugen.

3.10 Kavitäten trocknen

20 Minuten bei maximal 60% Luftfeuchtigkeit unter kontinuierlichem Luftstrom trocknen lassen.

Bei höherer Luftfeuchtigkeit kann sich die Trockenzeit verlängern. Alternativ 12 Stunden lichtgeschützt bei RT trocknen lassen.

4. Scannen

ViraChip® Microarrays mit dem ViraChip® Scanner oder dem ViraChip® Reader messen.

Messungen der ViraChip® Microarrays sind innerhalb von 24 Stunden nach Prozessierung durchzuführen (Mikrotiterplatte lichtgeschützt aufbewahren). Die genaue Durchführung bitte dem Geräte-Handbuch entnehmen.

5. Analysieren

5.1 Zuordnung der Antigen-Spottriplets und der Kontrollspots überprüfen (Technisch validieren)

Jeder Spot wird aufgrund seiner Position von der ViraChip® Software automatisch dem entsprechenden Antigen-Spottriolett bzw. dem entsprechendem Kontrollspot zugeordnet.

Die automatische Zuordnung muss visuell mit dem Muster entsprechend Abb. 1 überprüft werden. Zuordnungen, die nicht dem dargestellten Muster entsprechen im Feld „QC“ auf „nicht gültig“ setzen. Die entsprechende Probe muss wiederholt werden.

5.2 Gültigkeitsprüfung

Die Gültigkeitsprüfung wird von der ViraChip® Software automatisch durchgeführt.

Ein ViraChip® Microarray ist gültig, wenn folgende Kontrollspots die in der ViraChip® Software hinterlegten Kriterien erfüllen:

- **Serumkontrollen** (sc) über Grenzwert
- **Konjugatkontrollen IgG** (ccG) über Grenzwert
- Die Konjugatkontrollen IgG müssen stärker reagieren als die Kontrollen der anderen Konjugatklassen.
- **Kalibratorkontrollen** (cal) über Grenzwert
- **Negativkontrolle** (nc) unter Grenzwert

Falls eines der genannten Kriterien nicht erfüllt ist, wird der ViraChip® Microarray als „nicht gültig“ klassifiziert. Nicht gültige ViraChip® Microarrays dürfen nicht ausgewertet werden und müssen wiederholt werden.

5.3 Auswertung der ViraChip® Microarrays

Die Bewertung der Patientenproben wird von der ViraChip® Software automatisch nach den im Folgenden definierten Auswertekriterien durchgeführt:

Die ViraChip® Einheiten jedes Spottriplets werden unter Berücksichtigung der chargen-spezifischen Faktoren relativ zu den Kalibratorkontrollen durch die ViraChip® Software berechnet.

Auswertekriterien

ViraChip®-Einheiten der Spottriplets	Ergebnis	Beurteilung
PT-1 und/oder PT-2 und/oder PT-3 Spottriolett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten	Positiv	Anti-PT-IgG Antikörper gegen Bordetella pertussis nachweisbar. Zur weiteren Abklärung das Vorhandensein von IgA Antikörpern überprüfen und/oder ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (12).
FHA-1 und/oder FHA-2 Spottriolett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten	Positiv	Anti-FHA-IgG Antikörper gegen Bordetella species nachweisbar. Zur weiteren Abklärung das Vorhandensein von IgA Antikörpern überprüfen und/oder ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (12).
Kein Spottriolett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten	Negativ	Keine oder nur geringe Mengen von IgG Antikörpern gegen Bordetella species nachweisbar. Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht das Vorhandensein von IgA Antikörpern überprüfen und/oder ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (12).

Quantifizierung

Die anti-PT und anti-FHA Antikörperkonzentrationen sind mit dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG über die ViraChip® Software quantifizierbar.

Laut RKI ist ein einmalig deutlich erhöhter anti-PT Wert im IgG beweisend für einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis (12). Dies entspricht einer anti-PT-IgG Antikörperkonzentration von 100 IU/ml oder darüber, korreliert laut RKI Falldefinition mit einem "einmalig deutlich erhöhten Wert" (13) und gibt damit einen Hinweis auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis (12,11). Es kann sich ebenfalls um einen Impftiter handeln, wenn die Impfung weniger als 12 Monate zurückliegt (12).

Bei Erreichen einer anti-PT-IgG Antikörperkonzentration von 40 bis <100 IU/ml besteht der Verdacht auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis. Bei bestehendem klinischem Verdacht das Vorhandensein von IgA Antikörpern überprüfen und/oder ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (12).

Bei Erreichen einer anti-PT-IgG Antikörperkonzentration von 8 bis <40 IU/ml sind nur geringe Mengen von anti-PT Antikörpern nachweisbar, die zwar spezifisch detektiert werden können, jedoch nur geringe diagnostische Relevanz besitzen. Eine anti-PT-IgG Antikörperkonzentration von 8 IU/ml ist der Schwellenwert für den gesicherten quantitativen Nachweis von anti-PT-Antikörpern - dem „minimal level of quantitation“ (14).

Bei einer anti-FHA-IgG Antikörperkonzentration von 90 IU/ml oder darüber ist eine Infektion mit Bordetella species wahrscheinlich (9). Eine anti-FHA-IgG Antikörperkonzentration von 8 IU/ml ist der Schwellenwert für den gesicherten quantitativen Nachweis von anti-FHA-Antikörpern - dem „minimal level of quantitation“ (14).

Diagnostische Bedeutung von Bordetella Antikörpern

1. IgG Antikörper werden 15-20 Tage nach Krankheitsbeginn im Stadium convulsivum gebildet und sind im Frühstadium einer Infektion noch nicht nachweisbar (10). IgG Antikörper persistieren häufig über 10 Jahre aber mindestens 6 Monate nach Krankheitsbeginn (10,2). Daher sind Patienten im zweiten (Stadium convulsivum) oder dritten (Stadium decrementi) Krankheitsstadium meist positiv für IgG Antikörper. Bei Rekonvaleszenz sinken die Titer allmählich (18). Säuglinge können IgG Antikörper auch von der Mutter diaplazentar übertragen bekommen (7,4). Als Nachweis einer Bordetella pertussis Infektion wird laut RKI Falldefinition ein einmalig deutlich erhöhter Wert von mindestens 100 IU/ml für PT-IgG Antikörper gefordert (12,13). Der serologische Nachweis einer Infektion mit Bordetella pertussis ist möglich, wenn eine Impfung länger als 12 Monate zurückliegt (12).

2. IgM Antikörper treten etwa 8-15 Tage nach Krankheitsbeginn auf (10) und erreichen ihre höchste Konzentration nach etwa 8-10 Wochen (18). IgM Antikörper sind in über 90% der infizierten Patienten zwischen Tag 20 und 50 nach Krankheitsbeginn nachweisbar. IgM kann nach Impfung erhöht sein (5). IgM kann bei Kleinkindern und Erwachsenen in Einzelfällen schwach, verzögert oder nicht auftreten (2).

3. IgA Antikörper sind fast ausschließlich im Frühstadium nach natürlicher Infektion nachweisbar und nur selten nach einer Impfung (6,8). IgA Antikörper erreichen ihre höchste Konzentration etwa 8-10 Wochen nach Krankheitsbeginn (18). IgA ist häufig nicht länger als 6 Monate nach Infektion nachweisbar (10). Säuglinge bilden in den ersten Lebensmonaten nicht oder nur in einem geringen Umfang IgA, deshalb sollte bei Säuglingen der IgM Antikörpernachweis geführt werden (5). Es gibt Hinweise, dass Bordetella pertussis spezifische IgA Antikörper in der Normalbevölkerung als Folge subklinischer Infektionen persistieren können (5). Als Nachweis einer Bordetella pertussis Infektion wird laut RKI Falldefinition ein einmalig deutlich erhöhter Wert von mindestens 12 IU/ml für PT-IgA Antikörper gefordert (12,13).

4. Der Nachweis von Antikörpern gegen Pertussis Toxin (28 kD) ist spezifisch für Bordetella pertussis (7,18,4,15).

5. Medikamente und Immunglobulingaben können unspezifische Antikörperreaktionen hervorrufen (16).

6. Kreuzreaktionen mit FHA sind bei Infektionen mit M. pneumoniae, C. pneumoniae und anderen Bakterien bekannt (8).

Leistungsdaten

Die PT- und FHA-Antigenspotriplets wurden anhand des *WHO International Standard Pertussis Antiserum (Human) 1st* kalibriert (19,3,1,14). Zur Bestimmung der Reaktivität des Bordetella pertussis ViraChip® IgG wurden 141 unselektierte Blutspenderseren untersucht und die Testergebnisse bestimmt.

Bordetella pertussis ViraChip® IgG	Positiv über das PT Antigen, ≥ 8 IU/ml, % (n)	Positiv über das PT Antigen, ≥ 100 IU/ml, % (n)	Positiv über das FHA Antigen, ≥ 8 IU/ml, % (n)	Positiv über das FHA Antigen, ≥ 90 IU/ml, % (n)
Blutspender (n= 141)	50% (70)	1,4% (2)	72% (102)	3% (4)

Analyse von Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG

Bezogen auf das Vorhandensein von anti-PT IgG Antikörpern wurde in Referenzstudien gezeigt, dass 46% der Blutspenderseren mindestens dem „minimal level of quantitation“ (8 IU/ml) entsprechen (14). Auf dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG korreliert dies mit einem positiven Testergebnis über das PT Antigen. Bei der Untersuchung von 141 unselektierten Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG wurde in 50% der Fälle ein positives Testergebnis über das PT Antigen erhalten (siehe Tabelle 2).

In einer weiteren Studie mit 5366 Blutspenderseren wurde gezeigt, dass 2,9% der Probanden anti-PT IgG Antikörper über 94 IU/ml aufweisen, die auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis hinweisen (1). Bei der Untersuchung von 141 unselektierten Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG wurde in 1,4% (n = 2) der Fälle ein Testergebnis mit größer/gleich 100 IU/ml erhalten.

Bezogen auf das Vorhandensein von anti-FHA IgG Antikörpern wurde in Referenzstudien gezeigt, dass 86% der Blutspenderseren mindestens dem „minimal level of quantitation“ (8 IU/ml) entsprechen (14). Auf dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG korreliert dies mit einem positiven Testergebnis über das FHA Antigen. Bei der Untersuchung von 141 unselektierten Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis ViraChip® IgG wurde in 72% der Fälle ein positives Testergebnis über das FHA Antigen erhalten (siehe Tabelle 2). 3% (n = 4) der Fälle weisen ein Testergebnis größer/gleich 90 IU/ml auf.

Anforderungen an den Anwender

1. Dieser Test ist nur in einem Fachlabor durchzuführen, das die entsprechende Laborausstattung (z.B. nach GLP) und die ggf. erforderlichen behördlichen Genehmigungen zum Umgang mit den zu testenden Proben besitzt.

2. Um ein exaktes Testergebnis zu erhalten, müssen die Gebrauchsanweisung und „Good Laboratory Practice (GLP)“ eingehalten werden.

3. Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, das bezüglich des Testverfahrens geschult wurde.

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

1. ViraChip® Microarrays: Verschlossen in der Originalverpackung bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

2. Waschpuffer-Konzentrat, 10-fach: Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

3. Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung: Bei 2-8°C ca. 2 Wochen haltbar. Bei längerer Aufbewahrung kann die Gebrauchsverdünnung aliquotiert bei -20°C eingefroren werden.

4. Probenpuffer: Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

5. Konjugatlösung: Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

6. Chromogen/Substratlösung: Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum. Vor Lichteinfall schützen!

7. Nach erstmaligem Öffnen der Reagenzien und Kitkomponenten wird bei sachgerechter Anwendung („Good Laboratory Practice“) und Einhaltung der auf dem Etikett angegebenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung die Haltbarkeit in der Regel bis zum angegebenen Verfallsdatum beibehalten.

Vorsichtsmaßnahmen / Sicherheitsvorkehrungen

1. Alle humanen Serumkomponenten wurden auf HCV-, HIV1,2-Antikörper und HBS-Antigen untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kitkomponenten, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös betrachtet und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden. Bei Arbeiten mit potentiell gefährlichen oder infektiösen Materialien sind die entsprechenden nationalen / internationalen Gesetze, Verord-

nungen und Vorschriften zu beachten. Dies gilt ebenfalls für die Lagerung und Entsorgung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

2. Die Schutzmaßnahmen für das Arbeiten mit Gefahr- und Biostoffen sind gemäß den aktuell gültigen länderspezifischen Richtlinien für Laboratorien zu beachten. Maßnahmen sind unter anderem:

Bordetella pertussis ViraChip® IgG Test Kit 2.0

- 6 -

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Einweg-Handschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Am Arbeitsplatz nicht essen, trinken oder rauchen.
- 3. Die Berührung von Haut und Schleimhäuten mit Chromogen / Substratlösung vermeiden. Bei Berührung mit Haut und Augen sofort mit viel Wasser nachwaschen.
- 4. Proben und alle möglicherweise kontaminierten Materialien sowie flüssige infektiöse Abfälle sind gemäß allgemein anerkannter Laborrichtlinien zu dekontaminieren, z.B. durch ein mindestens 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C. Zur Entsorgung flüssiger Abfälle können diese z.B. mit Natriumhypochlorit in einem

- Volumenverhältnis gemischt werden, so dass das Endgemisch 1% Natriumhypochlorit enthält. Zur vollständigen Desinfektion 30 Minuten einwirken lassen.
- 5. Angaben über mögliche Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung von größeren Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind in den Sicherheitsdatenblättern dokumentiert.
- 6. Der Eintritt von Staub und anderen Verschmutzungen in die Kavitäten der MTP ist zu vermeiden, da daraus ungültige Ergebnisse resultieren können.

Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Patientenprobe

1. Der **Bordetella pertussis ViraChip® IgG Test Kit 2.0** ist mit humanem Serum als Probenmaterial durchzuführen.
2. Die Probengewinnung sollte durch medizinisches Fachpersonal nach den geltenden Standards aus Vollblut erfolgen (17).
3. Proben, die mit Hitze vorbehandelt wurden, hämolytisch, ikterisch oder lipämisch sind, können zu ungültigen Ergebnissen führen.
4. Proben dürfen nicht mikrobiell kontaminiert sein.
5. In der Regel können unverdünnte Proben bis zu 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine Lagerung bis zu 24 Monaten sind die Proben in Aliquots bei mindestens -20°C einzufrieren.

6. Vor Beginn der Testdurchführung sollten die Proben auf Raumtemperatur gebracht werden. Proben nach dem Auftauen vorsichtig mischen und bei Bedarf sichtbare Partikel durch Zentrifugation entfernen.
7. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Einschränkungen des Untersuchungsverfahrens

1. Ein positives Testergebnis der jeweiligen Patientenprobe ist als Symptom zu werten. Interpretation und Beurteilung von Testergebnissen dürfen nur durch medizinisches Fachpersonal unter Wertung aller relevanten Daten erfolgen (16).
2. Ein negatives Testergebnis schließt einen Erregerkontakt bzw. eine Infektion nicht aus.
3. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern kann bei Untersuchungen mit verschiedenen Testen bzw. mit verschiedenen Herstellern aufgrund von unterschiedlichen Sensitivitäten, Spezifitäten und Testmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.
4. Bei Immunsuppression gilt eine eingeschränkte Beurteilbarkeit (16).

5. Medikamente und Immunglobulingaben können unspezifische Antikörperreaktionen hervorrufen (16).
6. *In vitro*-Diagnostika dürfen nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden, da zuverlässige Ergebnisse dann nicht mehr gewährleistet sind.
7. Präzises Befolgen der Arbeitsvorschrift ist essentiell für exakte Testergebnisse. Ungenügendes Durchführen der Waschschriffe kann falsche Ergebnisse verursachen.
8. Der Ansatz von Poolproben, bei denen mehrere Seren gemeinsam untersucht werden, ist unzulässig, da bei derartigen Ansätzen die Testsensitivität und -spezifität beeinträchtigt werden können.

Hinweise zu Geräten und Software











1. Bei automatisierter Durchführung müssen für den jeweiligen Prozessortyp von Viramed Biotech AG validierte Arbeitsschritte programmiert und verwendet werden.
2. Bei Verwendung von Prozessorspezifischen Verbrauchsmaterialien sind die entsprechenden Konfigurationen nach Herstellerangaben von Viramed Biotech AG freizugeben.
3. Die von Viramed Biotech AG bereitgestellte Geräte- und Softwarekonfiguration darf nicht verändert werden. Jegliche Änderung kann falsche Ergebnisse verursachen.

4. Es ist ausschließlich gerätespezifische Software zu verwenden. Änderungen an Konfigurationsdateien dürfen nur von Viramed Biotech AG durchgeführt werden.
5. Als Messgeräte sind nur von Viramed Biotech AG zugelassene Systeme zu verwenden.
6. Die Auswertung der ViraChip® Microarrays erfolgt ausschließlich über die ViraChip® Software. Eine manuelle/visuelle Auswertung ist nicht möglich.

Literatur

1. BAUGHMAN, AL et al.: 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, *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004
2. BIBER, M & ENDRES, G: Pertussisverdacht und Labordiagnose, *Ärztl Lab* 34:97-102, 1988
3. DE MELKER, HE et al.: Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*, *J Clin Microbiol*, 2000
4. GUISO, N et al.: Westernblot analysis of antibody responses of young infants pertussis infection, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1993
5. HAHN, H et al.: Medizinische Mikrobiologie, Springer Verlag, Kap 12, Bordetellen, 1991
6. HENDRIKX, LH et al.: Serum IgA Responses against Pertussis Proteins in Infected and Dutch wP or aP Vaccinated Children: An Additional Role in Pertussis Diagnostics, *PlosONE*, 2011
7. MEADE, BD & Bollen, A: Serodiagnosis of pertussis, *Proc 6th Intl Symp Pertussis DHHS (FDA) Publication*, 1990
8. MERRIGAN, SD et al.: Comparison of Western Immunoblotting to an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the determination of Anti-Bordetella pertussis Antibodies, *Clin Vaccine Immunol*, 2011
9. PRINCE, HE et al.: Age-Related Differences in Patterns of Increased Bordetella pertussis Antibodies, *Clin Vaccine Immunol*, 2012
10. RAPP, J et al.: Diagnostische Verfahren zum Nachweis einer Pertussis-Infektion, *Ärztl Lab*, 1988
11. RIFFELMANN, M et al.: Pertussis - nicht nur eine Kinderkrankheit, *Dtsch Arzteblatt*, 2008
12. RKI Robert Koch Institut: Falldefinitionen zur Übermittlung von Erkrankungs- und Todesfällen sowie von Erregernachweisen von Mumps, Pertussis, Röteln und Varizellen, *Bundesgesundheitsblatt*, 2013
13. RKI Robert Koch Institut: Themen zum Meldewesen - Mumps, Pertussis, Röteln, Varizellen, *Infobrief* 39, 2013
14. SAEMANN-ISCHENKO, G et al.: Stability of Antibodies to Bordetella Antigens in German Adults, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001
15. STEPHAN, K: Infektionskrankheiten Keuchhusten Teil I, *MTA* 8., 1993
16. THOMAS, L: Labor und Diagnose, *Med Verlagsgesellschaft Marburg*, 2012
17. TUCK, MK et al.: Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection, *J Proteome Res*, 2009
18. WIRSING VON KÖNIG, CH: Labordiagnostik des Keuchhustens, *G1 Labor-Medizin*, 1985
19. XING, D et al.: Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study, *Clin Vaccine Immunol*, 2009

Symbolerklärungen

	Hersteller		Bestell-Nummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Verwendbar bis / Mindesthaltbarkeitsdatum
	<i>In-Vitro</i> Diagnostikum		Temperaturbegrenzung (Lagerung)
	Chargen-Nummer		Positives Kontrollserum
	Ausreichend für 96 Ansätze		Negatives Kontrollserum