

Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Test Kit

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

Der **Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Test Kit** ist ein Immunoblot auf Basis eines Enzym-Immunoassays im Line/Stripe Format, bei dem folgende aufgereinigte Bordetella-spezifische Antigene verwendet werden: Filamentöses Hämagglutinin (**FHA**) und Pertussis Toxin (**PT**). Das **Pertussis Toxin** ist in zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf dem Bordetella pertussis ViraStripe® IgG aufgetragen, um zwischen einem **kürzlichen Kontakt** mit Bordetella pertussis (einmalig deutlich erhöhter Wert im IgG) und einer **abgelaufenen Infektion** zu unterscheiden (1,2).

Die Reaktivitäten der Banden **PT**, **PT-100** und **FHA** wurden anhand von **WHO Standardseren** eingestellt und ermöglichen somit eine Korrelation mit Messwerten in Internationalen Units pro Milliliter (3)

Testprinzip

Bordetella-spezifische IgG Antikörper binden während der Seruminkubation an das fixierte Antigen auf dem Teststreifen. Während der Konjugatreaktion bindet das AP-Konjugat an den Antigen-Antikörper-Komplex. Die Alkalische Phosphatase setzt das Chromogen/Substrat um und färbt damit den Antigen-Antikörper-Komplex auf dem Teststreifen lila an. Die Waschschriffe nach der Seruminkubation, der Konjugatinkubation und der Chromogen/Substrat-Inkubation entfernen ungebundene Antikörper und Reagenzien.

Die grüne Trennlinie teilt den Teststreifen in einen Kontrollabschnitt und einen Analytabschnitt. Im Kontrollabschnitt befinden sich die **Negativkontrollbande**, die **Serumkontrolle**, **drei Konjugatkontrollen** (IgG, IgA, IgM) und die **Cut off Kontrolle**.

Der Teststreifencode für die Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Teststreifen ist **PG**. Die Teststreifen sind von **01** bis **50** nummeriert. Im Analytabschnitt befinden sich die Bordetella-spezifischen Antigene.

Best.-Nr.:	V-BPSGOK	Best.-Nr.:	V-BPSGDK (Deca Kit)
Packungsgröße:	1x 50 Teststreifen	Packungsgröße:	10x 50 Teststreifen
Probenmaterial:	20 µl Serum	Probenmaterial:	20 µl Serum
Testdauer:	ca. 90 Minuten	Testdauer:	ca. 90 Minuten

Kitinhalt

1x bzw. 10x 50 Teststreifen	Bordetella pertussis ViraStripe® Antigen Strips (IgG) Teststreifen mit Kontrollabschnitt und Bordetella-spezifischen Antigenen im Analytabschnitt, gebrauchsfertig	(Prod.-Nr.: V-BPSGAS)
1x bzw. 10x 9 ml	ViraStripe® / ViraBlot® AP-Anti-Human IgG Conjugate Konjugat-Konzentrat, Ziege	(Best.-Nr.: V-UVNGKI)
1x bzw. 10x 100 ml	ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Buffer Proben-/Waschpuffer-Konzentrat, 10-fach	(Best.-Nr.: V-UVNUWP)
1x bzw. 10x 5 g	ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Powder Proben-/Waschpuffersalz	(Best.-Nr.: V-UVNUMP)
1x bzw. 10x 90 ml	ViraStripe® / ViraBlot® Chromogen / Substrate Solution Chromogen/Substratlösung, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVNUCS)
1 bzw. 10 Exemplare	Auswerteprotokolle Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Test Kit	

Zusätzlich separat lieferbar

330 µl	Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Positive Control IgG positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-BPSGPK)
330 µl	Bordetella pertussis ViraStripe® IgG,A,M Negative Control IgG, IgA, IgM negatives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-BPSPNK)
50 Exemplare	Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Auswerteprotokolle für die automatisierte Auswertung mit der ViraScan® Software	(Best.-Nr.: V-BPSGEP)

Vorbereiten der Reagenzien und der Patientenproben

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Informationen zur Haltbarkeit finden Sie auf Seite 6.

Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung **Proben-/Waschpuffer-Konzentrat 1:10** in destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (100 ml Konzentrat + 900 ml Wasser). Anschließend Proben-/Waschpuffersalz komplett zugeben und solange mischen, bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hat. Eventuell 10-15 Minuten auf einen Magnetrührer stellen. Der pH-Wert sollte um pH 7,5 bei 20°C liegen.

Teststreifen: Benötigte Teststreifen vorsichtig mit der **Pinzette** an der **Beschriftung** fassen, vom Steg lösen und in die vorbereitete Inkubationswanne legen (Arbeitsvorschrift Punkt 2). Nach Entnahme aus der Verpackung sofort verwenden. Teststreifen nicht mit den Fingern berühren. Nicht benötigte Teststreifen sofort wieder in die Originalverpackung zurückgeben, dicht verschließen und bei 2-8°C lagern.

Patientenproben: Pro Ansatz werden **20 µl Patientenserum** unverdünnt eingesetzt.

Kontrollen: Pro Ansatz werden je **100 µl** des **positiven Kontrollserums** sowie des **negativen Kontrollserums** unverdünnt eingesetzt.

Konjugat-Gebrauchsverdünnung: **Konjugat-Konzentrat 1:10** mit Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung ansetzen (siehe Tabelle 1). Vor jedem Testansatz frisch ansetzen. Nicht aufbewahren.

Chromogen/Substratlösung: Gebrauchsfertig.

Herstellung der Konjugat-Gebrauchsverdünnung IgG

Anzahl Streifen	Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung	Konjugat-Konzentrat	Endvolumen	Anzahl Streifen	Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung	Konjugat-Konzentrat	Endvolumen		
1	1,35 ml	+	0,15 ml	1,5 ml	26	35,10 ml	+	3,90 ml	39,0 ml
2	2,70 ml	+	0,30 ml	3,0 ml	27	36,45 ml	+	4,05 ml	40,5 ml
3	4,05 ml	+	0,45 ml	4,5 ml	28	37,80 ml	+	4,20 ml	42,0 ml
4	5,40 ml	+	0,60 ml	6,0 ml	29	39,15 ml	+	4,35 ml	43,5 ml
5	6,75 ml	+	0,75 ml	7,5 ml	30	40,50 ml	+	4,50 ml	45,0 ml
6	8,10 ml	+	0,90 ml	9,0 ml	31	41,85 ml	+	4,65 ml	46,5 ml
7	9,45 ml	+	1,05 ml	10,5 ml	32	43,20 ml	+	4,80 ml	48,0 ml
8	10,80 ml	+	1,20 ml	12,0 ml	33	44,55 ml	+	4,95 ml	49,5 ml
9	12,15 ml	+	1,35 ml	13,5 ml	34	45,90 ml	+	5,10 ml	51,0 ml
10	13,50 ml	+	1,50 ml	15,0 ml	35	47,25 ml	+	5,25 ml	52,5 ml
11	14,85 ml	+	1,65 ml	16,5 ml	36	48,60 ml	+	5,40 ml	54,0 ml
12	16,20 ml	+	1,80 ml	18,0 ml	37	49,95 ml	+	5,55 ml	55,5 ml
13	17,55 ml	+	1,95 ml	19,5 ml	38	51,30 ml	+	5,70 ml	57,0 ml
14	18,90 ml	+	2,10 ml	21,0 ml	39	52,65 ml	+	5,85 ml	58,5 ml
15	20,25 ml	+	2,25 ml	22,5 ml	40	54,00 ml	+	6,00 ml	60,0 ml
16	21,60 ml	+	2,40 ml	24,0 ml	41	55,35 ml	+	6,15 ml	61,5 ml
17	22,95 ml	+	2,55 ml	25,5 ml	42	56,70 ml	+	6,30 ml	63,0 ml
18	24,30 ml	+	2,70 ml	27,0 ml	43	58,05 ml	+	6,45 ml	64,5 ml
19	25,65 ml	+	2,85 ml	28,5 ml	44	59,40 ml	+	6,60 ml	66,0 ml
20	27,00 ml	+	3,00 ml	30,0 ml	45	60,75 ml	+	6,75 ml	67,5 ml
21	28,35 ml	+	3,15 ml	31,5 ml	46	62,10 ml	+	6,90 ml	69,0 ml
22	29,70 ml	+	3,30 ml	33,0 ml	47	63,45 ml	+	7,05 ml	70,5 ml
23	31,05 ml	+	3,45 ml	34,5 ml	48	64,80 ml	+	7,20 ml	72,0 ml
24	32,40 ml	+	3,60 ml	36,0 ml	49	66,15 ml	+	7,35 ml	73,5 ml
25	33,75 ml	+	3,75 ml	37,5 ml	50	67,50 ml	+	7,50 ml	75,0 ml

Tabelle 1: Konjugat-Konzentrat 1:10 mit Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung ansetzen

Arbeitsvorschrift

- Inkubationswanne mit jeweils ca. 1,5 ml Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung spülen, Puffer abgießen**
- Die gewünschte Anzahl an Teststreifen in die Inkubationswanne legen - ein Teststreifen pro Rinne**
- Je 1,5 ml Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler inkubieren**
- Je 20 µl Patientenserum bzw. 100 µl Kontrollserum zugeben**
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren**
- Flüssigkeit abgießen**
- 3 x waschen:**
 - je 1,5 ml Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben
 - 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren
 - Flüssigkeit abgießen
- Je 1,5 ml frische Konjugat-Gebrauchsverdünnung zugeben**
- 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren**
- Flüssigkeit abgießen**
- 3 x waschen wie in Punkt 7**
- Je 1,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben und 1 Minute bei RT auf dem Schüttler inkubieren**
- Flüssigkeit abgießen**
- Je 1,5 ml Chromogen/Substratlösung zugeben**
- Bei RT auf dem Schüttler entwickeln**

Bordetella pertussis ViraStripe® IgG: ca. 5 bis 15 Minuten
- Stoppen: Flüssigkeit abgießen**
- 3 x mit je 1,5 ml dest. oder deionisiertem Wasser spülen**
- Teststreifen trocknen lassen und auswerten**

Inkubationswanne mit einem wasserunlöslichen Stift beschriften. Das Spülen entfernt Staubpartikel.

Pro Patienten- bzw. Kontrollserum je einen Teststreifen vorsichtig mit einer Pinzette an der Beschriftung fassen, vom Steg lösen und in die Inkubationswanne legen. **Die Seite mit der grünen Trennlinie und der Beschriftung muss nach oben weisen.**

Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen. Überlaufen vermeiden. **Puffer nicht abgießen.**

Seren direkt im Bereich der Beschriftung auf dem Teststreifen zugeben. Darauf achten, dass der Schüttler läuft, bzw. die Inkubationswanne nach jeder Serumzugabe schwenken.

Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen.

Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklopfen. **Beim Abgießen bleiben die Teststreifen am Inkubationswannenboden haften.**

Auf dem Schüttler. Restliche Flüssigkeit gut auf Filterpapier abklopfen.

Darauf achten, dass die Teststreifen vollständig mit Konjugat-Gebrauchsverdünnung bedeckt sind.

Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen.

Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklopfen.

Auf dem Schüttler.

Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen.

Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklopfen.

Darauf achten, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind.

Sobald die Cut off Kontrolle sichtbar ist, muss die Reaktion abgestoppt werden. **Die Cut off Kontrolle befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen. Achtung:** Zu langes Entwickeln verursacht Hintergrundfärbung.

Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklopfen.

Ohne Zwischeninkubation.

Inkubationswanne gut abklopfen. Teststreifen auf Filterpapier oder saugfähiges, ungebleichtes Papier legen und trocknen lassen.

Auswertung

- Auswerteprotokoll:** Daten in das Auswerteprotokoll aufnehmen. Die entwickelten Teststreifen auf das Auswerteprotokoll kleben. Dabei die grüne Trennlinie der Teststreifen exakt auf die im Protokoll vorgedruckte Trennlinie legen.
- Gültigkeit der Teststreifen:** Ein Teststreifen ist gültig, wenn folgenden Banden sichtbar sind:
 - Die **Serumkontrolle**.
 - Die **Konjugatkontrolle** der untersuchten Konjugatklasse. Falls mehr als eine der drei Konjugatkontrollen auftreten, muss die stärkste Bande der untersuchten Konjugatklasse entsprechen.
 - Die **Cut off Kontrolle**.**und** wenn folgende Bande **nicht** sichtbar ist:
 - Die **Negativkontrollbande**.
 Ungültige Teststreifen nicht auswerten!
- Zuordnung der Antigenbanden:** Die grüne Trennlinie des Teststreifens gibt die Orientierung für die Zuordnung der Antigenbanden zu dem Bandlocator auf dem Auswerteprotokoll an. Banden zuordnen und entsprechend Punkt 4 protokollieren.
- Bandenbewertung:** Entsprechend den Qualitätsrichtlinien im Labor soll pro Testansatz eine Cut off Kontrolle mitgeführt werden (4). **Die Cut off Kontrolle für den Bordetella pertussis ViraStripe® IgG befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen.** Die Intensität der Cut off Kontrolle gibt den Schwellenwert an, ab dem eine Bande gewertet wird:
 - Eine Bande wird als **deutlich** gewertet, wenn die Intensität **gleich** oder **größer** als die Intensität der Cut off Kontrolle ist. Entsprechende Banden werden im Auswerteprotokoll mit **X** gekennzeichnet.
 - Eine Bande wird als **schwach** gewertet, wenn die Intensität **kleiner** als die Intensität der Cut off Kontrolle ist. Entsprechende Banden werden im Auswerteprotokoll mit **(X)** gekennzeichnet. **Achtung:** Banden, die nur ganz minimal zu erkennen sind, werden nicht gewertet.
 - Eine Bande wird nicht gewertet, wenn sie **nicht vorhanden** ist.
- Beurteilung der Patientenbanden:** Die Patientenbanden sind als Krankheitssymptome zu werten. Eine endgültige Diagnose sollte immer unter Wertung von Anamnese, Klinik und Labordaten erfolgen.
 - Als **hochspezifisch** für Bordetella pertussis gelten die Banden **PT / PT-100 (28 kD)** und für Bordetella species die Bande **FHA (220 kD)**.
 - Das Bordetella pertussis Toxin ist in zwei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen: PT und PT-100. Die PT Bande zeigt spezifische IgG Antikörper gegen Bordetella pertussis Toxin an. Die PT-100 Bande reagiert nur deutlich mit Serumproben, die erhöhte spezifische IgG Antikörper-mengen (größer gleich 100 IU/ml) gegen Bordetella pertussis Toxin enthalten.

IgG Interpretationskriterien

Allgemein gilt: Die Bandenintensitäten werden anhand der Cut off Kontrolle bestimmt. Diese befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen. Deutliche Banden haben eine Intensität \geq der Cut off Kontrolle. Schwache Banden haben eine Intensität $<$ der Cut off Kontrolle.

Auftretende Banden	Ergebnis	Beurteilung
Deutliche PT Bande und deutliche PT-100 Bande	Positiv	PT-IgG Antikörper gegen Bordetella pertussis nachweisbar. Diese Bandenkonstellation entspricht einer PT-IgG Antikörperkonzentration um 100 IU/ml oder darüber. Dies korreliert laut RKI Falldefinition mit einem "einmalig deutlich erhöhten Wert" (2) und gibt damit einen Hinweis auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis (1,5). Es kann sich auch um einen Impfter handelnd, wenn die Impfung weniger als 12 Monate zurückliegt (1).
Deutliche PT Bande und schwache PT-100 Bande	Positiv	PT-IgG Antikörper gegen Bordetella pertussis nachweisbar. Diese Bandenkonstellation entspricht einer PT-IgG Antikörperkonzentration um 40 IU/ml oder darüber. Verdacht auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis. Zur weiteren Abklärung das Vorhandensein von IgA Antikörpern überprüfen und/oder ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (1).
Deutliche PT Bande und keine PT-100 Bande	Positiv	PT-IgG Antikörper gegen Bordetella pertussis nachweisbar. Diese Bandenkonstellation entspricht einer PT-IgG Antikörperkonzentration um 8 IU/ml oder darüber. Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht das Vorhandensein von IgA Antikörpern überprüfen und/oder ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (1).
Keine oder schwache PT Bande und keine PT-100 Bande	Negativ	Keine oder nur geringe Mengen an PT-IgG Antikörper gegen Bordetella pertussis nachweisbar. Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht das Vorhandensein von IgA Antikörpern überprüfen und/oder ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (1).
Deutliche FHA Bande	Positiv	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 (1)
Keine oder schwache FHA Bande	Negativ	Keine oder nur geringe Mengen an FHA-IgG Antikörper 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 (1).

IgG / IgA Interpretationskriterien der Pertussis Toxin (PT) Banden

PT-100 IgG	PT IgG	PT IgA	PT Gesamtbeurteilung	Interpretation der Ergebniskonstellation aus IgG und IgA
x	x	x (x) ∅	Positiv	Hinweis auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis (1,2,5). Es kann sich auch um einen Impftiter handeln, wenn die Impfung weniger als 12 Monate zurückliegt. PT-IgA Antikörper werden nach Impfung allerdings nur in Ausnahmefällen beobachtet (6,7).
(x) ∅	x (x) ∅	x	Positiv	
(x)	x	(x) ∅	Positiv	Verdacht auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis. Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (1).
∅	x	(x) ∅	Positiv	Verdacht auf einen Impftiter oder eine zurückliegende Infektion. Ein sehr frühes Infektionsstadium kann nicht ausgeschlossen werden. Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (1).
(x) ∅	(x) ∅	(x)	Grenzwertig	Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (1).
∅	(x) ∅	∅	Negativ	Kein Hinweis auf eine Infektion mit Bordetella pertussis, bzw. kein Impftiter.

Tabelle 2: Ergebnisse der PT Banden des Bordetella pertussis ViraStripe® IgG, IgA und ihre labordiagnostische Bewertung. Legende: x = deutliche Bande; (x) = schwache Bande; ∅ = nicht-vorhandene Bande; Die für die Interpretation entscheidenden Banden der Ergebniskonstellation sind grau hinterlegt.

IgG / IgA Interpretationskriterien der filamentösen Hämagglutinin (FHA) Banden

FHA IgG	FHA IgA	FHA Gesamtbeurteilung	Interpretation der Ergebniskonstellation aus IgG und IgA
x (x) ∅	x	Positiv	Verdacht auf einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella species (8).
x	(x) ∅	Positiv	Verdacht auf einen Impftiter oder eine zurückliegende Infektion (1).
(x) ∅	(x)	Grenzwertig	Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht ein zweites Patientenserum nach 2-4 Wochen untersuchen (1).
(x) ∅	∅	Negativ	Kein Hinweis auf eine Infektion mit Bordetella species, bzw. kein Impftiter.

Tabelle 3: Ergebnisse der FHA Banden des Bordetella pertussis ViraStripe® IgG, IgA und ihre labordiagnostische Bewertung. Legende: x = deutliche Bande; (x) = schwache Bande; ∅ = nicht-vorhandene Bande; Die für die Interpretation entscheidenden Banden der Ergebniskonstellation sind grau hinterlegt.

IgG Teststreifen

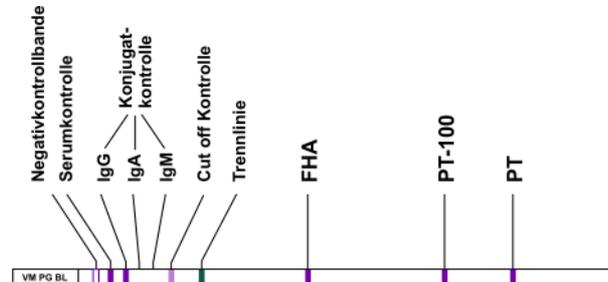


Abbildung 1: Schematische Abbildung eines Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Teststreifens in Originalgröße.

Nomenklatur und Beschreibung der Bordetella Banden 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 (9). Antikörper gegen FHA werden nach Impfung und nach Infektion mit Bordetella pertussis oder Bordetella parapertussis gebildet.
PT-100 (28 kD) Pertussis Toxin	Hochspezifisch für Bordetella pertussis. Die PT-100 Bande wurde an internationalen WHO Standards geeicht und entspricht in Cut off Intensität einem Wert um 100 IU/ml (3,10,11). Laut RKI ist ein einmalig deutlich erhöhter Wert im IgG beweisend für einen kürzlichen Kontakt mit Bordetella pertussis (1). Dieser Wert entspricht einer deutlichen PT-100 Bande.
PT (28 kD) Pertussis Toxin	Hochspezifisch für Bordetella pertussis. Über 90% der infizierten Patienten bilden IgG Antikörper bzw. 40-50% IgA Antikörper gegen PT (9). Antikörper gegen PT werden nach Impfung und Infektion mit Bordetella pertussis, nicht aber nach Bordetella parapertussis Infektion gebildet. Die PT-IgG Bande wurde an internationalen WHO Standards geeicht und entspricht in Cut off Intensität einem Wert um 8 IU/ml (3,12).

Diagnostische Bedeutung von Bordetella pertussis Antikörpern

1. IgG Antikörper werden 15-20 Tage nach Krankheitsbeginn im Stadium convulsivum gebildet und sind im Frühstadium einer Infektion noch nicht nachweisbar (13). IgG Antikörper persistieren häufig über 10 Jahre aber mindestens 6 Monate nach Krankheitsbeginn (13,14). Daher sind Patienten im zweiten (Stadium convulsivum) oder dritten (Stadium decrementi) Krankheitsstadium meist positiv für IgG Antikörper. Bei Rekonvaleszenz sinken die Titer allmählich (15). Säuglinge können IgG Antikörper auch von der Mutter diaplazentar übertragen bekommen (9,16).

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 (1,2). Dieser Wert entspricht einer deutlichen PT-100 Bande auf dem Bordetella pertussis ViraStripe® IgG.

Der serologische Nachweis einer Infektion mit Bordetella pertussis ist möglich, wenn eine Impfung länger als 12 Monate zurückliegt (1).

2. IgM Antikörper treten etwa 8-15 Tage nach Krankheitsbeginn auf (13) und erreichen ihre höchste Konzentration nach etwa 8-10 Wochen (15). IgM Antikörper sind in über 90% der infizierten Patienten zwischen Tag 20 und 50 nach Krankheitsbeginn nachweisbar. IgM kann nach Impfung erhöht sein (17). IgM kann bei Kleinkindern und Erwachsenen in Einzelfällen schwach, verzögert oder nicht auftreten (14).

3. IgA Antikörper sind fast ausschließlich im Frühstadium nach natürlicher Infektion nachweisbar und nur selten nach einer Impfung (6,7). IgA Antikörper erreichen ihre höchste Konzentration etwa 8-10 Wochen nach Krankheitsbeginn (15). IgA ist häufig nicht länger als 6 Monate nach Infektion nachweisbar (13). Säuglinge bilden in den ersten Lebensmonaten nicht oder nur in einem geringen Umfang IgA, deshalb sollte bei Säuglingen der IgM Antikörnernachweis geführt werden (17).

Es gibt Hinweise, dass Bordetella pertussis spezifische IgA Antikörper in der Normalbevölkerung als Folge subklinischer Infektionen persistieren können (17).

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 (1,2). Dieser Wert entspricht einer deutlichen PT Bande auf dem Bordetella pertussis ViraStripe® IgA.

4. Der Nachweis von Antikörpern gegen Pertussis Toxin (28 kD) ist spezifisch für Bordetella pertussis (9,15,16,18).

5. Medikamente und Immunglobulingaben können unspezifische Antikörperreaktionen hervorrufen (19).

6. Kreuzreaktionen mit FHA sind bei Infektionen mit M. pneumoniae, C. pneumoniae und anderen Bakterien bekannt (7).

IgG Leistungsdaten

Analyse zur Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der Sensitivität des Bordetella pertussis VirasStripe® IgG Test Kit wurden WHO Standards untersucht, die eine definierte Menge an anti-PT und anti-FHA Antikörpern enthalten, gemessen in International Units per Milliliter (IU/ml) (3).

Die **PT Bande** weist folgendes Reaktionsspektrum auf: Deutliche Bande ab dem Bereich um 8 IU/ml, bezogen auf anti-PT IgG Antikörper.

Die **PT-100 Bande** weist folgendes Reaktionsspektrum auf: Deutliche Bande ab dem Bereich um 100 IU/ml, bezogen auf anti-PT IgG Antikörper.

Die **FHA Bande** weist folgendes Reaktionsspektrum auf: Deutliche Bande ab dem Bereich um 20 IU/ml, bezogen auf anti-FHA IgG Antikörper.

Zur Bestimmung der Reaktivität des Bordetella pertussis VirasStripe® IgG Test Kit wurden 145 unselektierte Blutspenderseren untersucht und ihre Reaktivitäten bestimmt.

Bordetella pertussis VirasStripe® IgG	Positiv mit der PT Bande, % (n)	Positiv mit der PT-100 Bande, % (n)	Positiv mit der FHA Bande, % (n)
Blutspender (n= 145)	51% (74)	5% (8)	82% (119)

Tabelle 4: Analyse von Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis VirasStripe® IgG Test Kit

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 (12). Auf dem Bordetella pertussis VirasStripe® IgG korreliert dies mit einer deutlichen **PT-Bande**. Bei der Untersuchung von 145 unselektierten Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis VirasStripe® IgG Test Kit wurde in 51 % der Fälle ein positives Testergebnis mit der PT Bande erhalten (siehe Tabelle 4).

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 (11). Auf dem Bordetella

pertussis VirasStripe® IgG korreliert dies mit einer deutlichen **PT-100 Bande**. Bei der Untersuchung von 145 unselektierten Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis VirasStripe® IgG Test Kit wurde in 5 % der Fälle ein positives Testergebnis mit der PT-100 Bande erhalten (siehe Tabelle 4).

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 (12). Bei der Untersuchung von 145 unselektierten Blutspenderseren mit dem Bordetella pertussis VirasStripe® IgG Test Kit wurde in 82 % der Fälle eine mindestens deutliche **FHA Bande** (um 20 IU/ml) detektiert (siehe Tabelle 4).

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, Verordnungen 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. Allgemein sollten beim Umgang mit biologischen und chemischen Arbeitsstoffen die Richtlinien zur „Guten Laborpraxis (GLP)“ angewendet werden. Allgemeine Hygienemaßnahmen sind unter anderem:

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Einweg-Handschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Am Arbeitsplatz nicht essen, trinken oder rauchen.

3. Die Chromogen/Substratlösung enthält BCIP und NBT. Berührung mit Haut und Schleimhäuten 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 Labortechniken zu dekontaminieren, z.B. durch ein mindestens 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C bei feuchter Hitze. 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. Bitte beachten Sie die Angaben in den Sicherheitsdatenblättern 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.

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

1. **Teststreifen:** Verschllossen in der Originalverpackung bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

2. **Konjugat-Konzentrat:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

3. **Konjugat-Gebrauchsverdünnung:** Vor jedem Testansatz frisch ansetzen. Nicht aufbewahren.

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

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

6. **Proben-/Waschpuffersalz:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

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

Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Testkit

- 7 -

Hinweise zum Probenmaterial

1. Der **Bordetella pertussis ViraStripe® IgG Test Kit** ist mit Serum als Probenmaterial durchzuführen.
2. Es sind nur klare, nicht-hämolytierte und nicht mikrobiell kontaminierte Proben zu verwenden.
3. Proben, die mit Hitze vorbehandelt wurden, hämolytisch, ikterisch oder lipämisch sind, können zu falschen Ergebnissen führen.

Einschränkungen des Verfahrens

1. Um ein exaktes Testergebnis zu erhalten, müssen die Gebrauchsanweisung und „Good Laboratory Practice“ genau eingehalten werden.
2. Ein positives Testergebnis wird aufgrund erhöhter spezifischer Antikörpertiter erreicht und ist wie ein Symptom zu werten. Der Rückschluss auf eine Infektion ist nur bedingt möglich.
3. Ein negatives Testergebnis schließt einen Erregerkontakt bzw. eine Infektion nicht aus.
4. Dieser Test ist nur durchzuführen von Fachpersonal, das bezüglich des Testverfahrens geschult wurde.
5. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern kann bei Untersuchungen

4. In der Regel können unverdünnte Proben bis zu 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung sind die Proben in Aliquots bei -20°C (oder kälter) einzufrieren.
5. 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.
6. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

- mit verschiedenen Testen bzw. von verschiedenen Herstellern aufgrund von unterschiedlichen Sensitivitäten, Spezifitäten und Testmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.
6. Teststreifen mit extrem starkem Hintergrund sind nicht auszuwerten, vor allem wenn Banden heller als der Hintergrund erscheinen.
 7. *In vitro*-Diagnostika dürfen nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden, da zuverlässige Ergebnisse dann nicht mehr gewährleistet sind.
 8. Gründliches Waschen ist essentiell für exakte Testergebnisse. Ungenügendes Waschen kann falsche Ergebnisse verursachen.

Literatur

1. ROBERT KOCH INSTITUT: Bundesgesundheitsblatt 2013
2. ROBERT KOCH INSTITUT: Themen zum Meldewesen – Infobrief 39 (2013)
3. XING, D. et al.: Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. Clin. Vaccine Immunol. 16(3):303-11 (2009)
4. RILI-BÄK: BÄK-Richtlinie zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. (2008), www.bundesaeztekammer.de
5. RIFFELMANN, M. et al.: Pertussis - nicht nur eine Kinderkrankheit. Deutsches Ärzteblatt, Jg. 105, Heft 37, (2008)
6. HENDRIKX, L.H. 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; 11 (6)
7. 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 Apr;18(4):615-20.
8. WIRSING VON KÖNIG, CH. Konsiliarlabor für Bordetellen, Krefeld: http://labor-krefeld.de/www/Hygiene/alpha1/htm/VI/VI_SA_PT_FHA_E_02.htm. 2012 Dez
9. MEADE, B. D. et al.: Serodiagnosis of pertussis, p. 322. In: Manclark CR: Proc. 6th Intl. Symp. Pertussis. DHHS (FDA) Publication No. 90-1164; Bethesda, MD, (1990)
10. de MELKER, H. E. 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. 38(2):800-6 (2000)
11. BAUGHMAN, A. L. 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. 11(6):1045-53 (2004)
12. SAEMANN-ISCHENKO, G. et al.: Stability of Antibodies to Bordetella Antigens in German Adults. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20:850-853 (2001)
13. RAPP, J. et al.: Diagnostische Verfahren zum Nachweis einer Pertussis-Infektion. Ärztl. Lab. 34:181-189 (1988)
14. BIBER M, Enders G. Pertussisverdacht und Labordiagnose. Ärztl. Lab. 34:97-102 (1988)
15. WIRSING VON KÖNIG, C. H.: Labordiagnostik des Keuch Hustens. GI Labor-Medizin 6:407-410 (1985)
16. GUISSO, N. et al.: Westernblot analysis of antibody responses of young infants pertussis infection. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(8):596-600 (1993)
17. HAHN, H. et al.: Medizinische Mikrobiologie. Springer Verlag, Kap. 12, Bordetellen (1991)
18. STEPHAN, K.: Infektionskrankheiten. Keuchhusten Teil I. MTA 8:686-689 (1993)
19. THOMAS, L.: Labor und Diagnose. Med. Verlagsgesellschaft Marburg (2008)

Symbolerklärungen

	Hersteller		Bestellnummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Verwendbar bis / Mindesthaltbarkeitsdatum
	<i>In-Vitro</i> Diagnostikum		Temperaturbegrenzung (Lagerung)
	Chargen-Nummer		Positive Serumkontrolle
	Ausreichend für 50 Ansätze		Negative Serumkontrolle
	Raumtemperatur in °C		Kontrolle
	Bearbeiter		Datum
	Probennummer		Chromogen/Substratentwicklungszeit in Minuten
	Auswerteprotokoll		Protokollnummer