



SeroPertussis™ Toxin IgG

ELISA für die quantitative Bestimmung von spezifischen IgG Antikörpern von ***Bordetella Pertussis Toxin*** im menschlichen Serum

Bedienungsanleitung

Testpackung für 96 Bestimmungen
(Katalognummer 1231-01)

Für diagnostische ***In Vitro*** Anwendung
Lagerung bei 2-8° C. **Nicht einfrieren.**

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St.
Ashdod 77610
ISRAEL
Tel.: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-Mail: support@savyondiagnosics.com

Verwendungszweck

Der SeroPertussis Toxin™ IgG Assay ist ein ELISA für die Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *Bordetella Pertussis* Toxin im humanen Serum oder Plasma.

Für die diagnostische ***In Vitro*** Anwendung

Einführung

Keuchhusten (Pertussis) ist eine hoch ansteckende bakterielle alle Altersgruppen betreffende Infektion der Atemwege, die durch *Bordetella pertussis* gramnegative Bakterien-ausschließlich ein humaner Erreger-verursacht wird. Die Übertragung der Erreger erfolgt durch Tröpfchen, welche durch Husten oder Niesen bei direktem Kontakt mit einer infizierten Person aufgenommen werden.

Rund neunzig Prozent der Kontakte im gefährdeten Umfeld entwickeln eine klinische Erkrankung nach Kontakt.

Trotz umfangreicher Impfungen im Kindesalter seit mehreren Jahrzehnten bleibt Keuchhusten einer der weltweit führenden Ursachen bei den Todesfällen, die durch Impfungen vermieden werden könnten (1, 2).

Am Schwerwiegendsten tritt diese Erkrankung bei den nicht-geimpften Säuglingen und Kleinkindern auf, die die am meisten gefährdete Gruppe mit den meisten auftretenden Komplikationen und Todesfällen bilden.

Die Krankheit verläuft meistens milder bei Jugendlichen und Erwachsenen, die allerdings Quelle der Ansteckung für die Kleinkinder sind (3).

Epidemiologie:

Keuchhusten ist eine Volkskrankheit, allerdings treten Epidemien nur alle 3 - 5 Jahre auf.

In den USA werden jedes Jahr durchschnittlich 5000-7000 Fälle gemeldet. Laut den Berichten leiden 21% von den Erwachsenen in USA mit verlängertem Husten (Dauer >2

Wochen) unter Pertussis (4). Laut WHO wurden 2008 16 Millionen Fälle weltweit berichtet, 95% davon in Entwicklungsländern und etwa 195,000 Kinder sind daran gestorben (5).

Seit 2011 wird eine Zunahme der Pertussis-Fälle in verschiedenen Teilen der Welt berichtet, auch in den Gebieten, wo die Impfungsrate hoch ist. In Europa entwickelt sich die Situation ähnlich und mehrere Länder beobachten eine Zunahme der Fälle bei Säuglingen, Jugendlichen und Erwachsenen (6).

Immunisierung und Impfung:

Während man noch wenig über die Dauer des Schutzes nach einer Pertussis-Impfung in den Entwicklungsländern weiß, zeigen mehrere Studien in den industrialisierten Ländern, dass der Schutz nach 4-12 Jahren abnimmt (7, 8). Infektionen bei geimpften Personen bewirken eine mildere unspezifische Krankheit ohne die klassischen klinischen Entwicklungsstadien von Keuchhusten, welche nur in 6% dieser Fälle auftreten. Stattdessen tritt die Erkrankung in Form eines unspezifischen, verlängerten Hustens auf, welcher mehrere Wochen bis Monate andauern kann. Aufgrund dieser atypischen Symptome wird Pertussis bei Erwachsenen und Jugendlichen nicht genügend diagnostiziert, die dadurch wieder Träger für die Infektion von ungeimpften Säuglingen und Kleinkindern sein können (4, 6, 9).

Management:

Frühe antimikrobielle Behandlung reduziert die Schwere der Symptome und begrenzt den Übertragungszeitraum. Sofortige Identifizierung der Fälle kann dazu beitragen, dass ungeimpfte oder nicht ausreichend geimpfte Personen durch Impfung oder durch anti-mikrobielle Prophylaxe nicht infiziert werden.

Diagnose:

Die Labordiagnostik von Pertussis kann entweder durch direkten Test, wie etwa Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder durch Kultur, oder indirekt mittels Serologie, bei der die spezifische Antikörperantwort gemessen wird, erfolgen. Da die Bakterien sich in den oberen Atemwegen während der ersten drei Wochen der Infektion aufhalten, können diese während dieser Zeit nur durch direkte Verfahren nachgewiesen werden (10, 11, 12).

Serologische auf ELISA basierende Tests für Pertussis Toxin werden für den spezifischen Nachweis von Antikörpern gegen *B. Pertussis* empfohlen, da sie zwischen einer *B. pertussis* und *B. parapertussis* Infektion unterscheiden können. (13). Zur serologischen Diagnose ist eine signifikante Änderung der Anti-Pertussis Toxin Antikörper (≥ 2 -Fache Veränderung der IgG-Werte) zwischen den Serumpaaren die zuverlässigste Indikation für eine aktuelle akute Infektion, bei Fehlen einer bestehenden Impfung im vergangenen Jahr. (13, 14). Es wird jedoch aus verschiedenen Gründen eine „Ein-Punkt“ ELISA Serologie am häufigsten in der klinischen Praxis verwendet (13, 14, 15, 16). Konzentrationen von Antikörpern gegen *B. Pertussis* Antigene sollten quantitativ in internationalen Einheiten pro Milliliter (IU/ml) angegeben werden, da Referenz-Präparate verfügbar sind.

Das SeroPertussis™ Toxin IgG verwendet gereinigtes Pertussis Toxin als Antigen, so dass die quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen Pertussis Toxin nach dem ersten Internationalen WHO Standard möglich ist

(WHO International Standard Pertussis Antiserum, Human 1. IS NIBSC Code 06/140) (17).

Testprinzip

- SeroPertussis™ Toxin Mikrotiterplatten sind mit angereicherten Bestandteilen von *Bordetella Pertussis* Toxin beschichtet.
- Das zu prüfende Serum wird 1/101 verdünnt und in der SeroPertussis Toxin™ Platte inkubiert. In diesem Schritt werden B. Pertussis Toxin spezifische Antikörper an die immobilisierten Antigene gebunden.
- Nicht-spezifische Antikörper werden durch Waschen entfernt.
- Nicht menschliches IgG konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP) wird hinzugefügt. In diesem Schritt wird das HRP-Konjugat an den vorgebundenen Antigen-Antikörper-Komplex gebunden.
- Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt.
- TMB-Substrat wird hinzugefügt und durch die Peroxidase hydrolysiert. Dies resultiert in einer blauen Lösung des reduzierten Substrats.
- Nach der Zugabe der Stopplösung wird die blaue Farbe Gelb und die Absorption sollte durch ein ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450/620nm gelesen werden.
- Die Absorption ist proportional zu den Mengen der spezifischen Antikörper, die an die beschichteten Antigene gebunden sind.

Zusammenfassung des Verfahrens: Manuell/Automation*

Fügen Sie 100 µl von jedem gebrauchsfertigen Kalibrator (RTU) C10, C20, C40 und 100µl der Negativ-Kontrolle, Positiv-Kontrolle und Proben, die 1/101 verdünnt sind, zu den Mikrotiterplatten Wells hinzu, welche mit spezifischen immundominanten *B. Pertussis* Toxin-Proteinen beschichtet sind

↓
Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie diese eine Stunde bei 37°C und bei einer Luftfeuchtigkeit von 100%

↓
Waschen Sie die Platte fünfmal mit einem Waschpuffer

↓
Fügen Sie 100 µl des RTU-HRP-Konjugats hinzu

↓
Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie diese eine Stunde bei 37° C und bei einer Luftfeuchtigkeit von 100%

↓
Waschen Sie die Platte fünfmal mit einem Waschpuffer

↓
Fügen Sie 100 µl des TMB Substrats hinzu

↓
Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie diese 15 Minuten bei Raumtemperatur

↓
Fügen Sie 100 µl der Stopplösung hinzu

↓
Lesen Sie die Absorption bei 450/620nm

↓
Berechnen und interpretieren Sie die Resultate

*Automationsverfahren:

Probeninkubation: 25 Minuten bei Raumtemperatur gefolgt von einer weiteren Inkubation von 35 Minuten bei 35°C.

Konjugatinkubation: 15 Minuten bei Raumtemperatur gefolgt von einer weiteren Inkubation von 35 Minuten bei 35°C.

Waschschritte: 5 Waschzyklen.

Packungsinhalt: für die manuelle und automatische Verwendung

Testpackung für 96 Bestimmungen Katalognummer 1231-01

1. **B. Pertussis Toxin Antigen mit beschichteter Mikrotiterplatte:** 96 abbrechbare Wells (8x12), die mit gereinigtem *Bordetella Pertussis* Toxin Antigen beschichtet sind, welche in einem Aluminiumbeutel verpackt und mit einem Trockenmittel versehen sind. **1 Platte**
2. **Konzentrierter Waschpuffer (20X):** Ein PBS – Tween-Puffer. Enthält weniger als 0,05% Proclin als Konservierungsmittel. **1 Flasche, 100 ml**
3. **Serumverdünner:** Eine gebrauchsfertige Pufferlösung. Enthält weniger als 0,05% Proclin als Konservierungsmittel. **2 Flaschen, 60 ml**
4. **Positive Kontrolle:** Ein gebrauchsfertiges *B. Pertussis* Toxin IgG positives menschliches Serum. Enthält quecksilberfreie und azidfreie Konservierungsstoffe. **1 Ampulle, 2 ml**
5. **Negative Kontrolle:** Ein gebrauchsfertiges *B. Pertussis* Toxin IgG negatives menschliches Serum. Enthält quecksilberfreie und azidfreie Konservierungsstoffe. **1 Ampulle, 2 ml**
6. **C30 Kalibrator:** Ein gebrauchsfertiger Kalibrator mit 30 IU / ml (beliebige internationale Einheiten) menschlich spezifischer IgG-Antikörper gegen *B. Pertussis* Toxin. Enthält quecksilberfreie und azidfreie Konservierungsstoffe. **1 Ampulle, 2 ml**
7. **C60 Kalibrator:** Ein gebrauchsfertiger Kalibrator mit 60 IU / ml (beliebige internationale Einheiten) menschlich spezifischer IgG-Antikörper gegen *B. Pertussis* Toxin. Enthält quecksilberfreie und azidfreie Konservierungsstoffe. **1 Ampulle, 2 ml**
8. **C120 Kalibrator:** Ein gebrauchsfertiger Kalibrator mit 120 IU / ml (beliebige internationale Einheiten) menschlich spezifischer IgG-Antikörper gegen *B. Pertussis* Toxin. Enthält quecksilberfreie und azidfreie Konservierungsstoffe. **1 Ampulle, 2 ml**
9. **HRP-Konjugat:** Gebrauchsfertige Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert mit anti-Humanen IgG (γ kettenspezifisch). Enthält quecksilberfreie und azidfreie Konservierungsstoffe. **1 Flasche, 15 ml**
10. **TMB-Substrat:** Eine gebrauchsfertige Lösung. Enthält 3, 3', 5, 5' – Tetramethylbenzidine als Chromogen und Peroxidase als Substrat. **1 Flasche, 16 ml**
11. **Stopplösung:** Eine gebrauchsfertige Lösung. Enthält 1M H₂SO₄. **1 Flasche, 16 ml**
12. **Plattenabdeckung:** **1 Stk.**
13. **Bedienungsanleitung:** **1**
14. **CD** **1**

Notwendige Materialien, die nicht mitgeliefert werden

1. Saubere Röhren für die Verdünnung von Patientenserum.
2. Verstellbare Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten (5-50, 50-200 und 200-1000 µl Bereiche) und Einwegspritzen.
3. Ein Liter Messkolben.
4. Ein 50 ml-Messzylinder.
5. Waschflasche.
6. Papierhandtücher
7. Vortex-Mischer,
8. Ein 37°C Wasserbad mit einem Deckel oder eine Feuchtkammer, die in einem 37°C-Inkubator platziert werden kann.
9. ELISA-Reader mit 450 und 620nm Filtern.
10. Destilliertes oder doppelt deionisiertes Wasser.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In Vitro* diagnostischen Verwendung

1. Diese Packung enthält menschliche Seren, die von der FDA und durch CE zugelassene Techniken getestet wurden. Es wurde festgestellt, dass diese negativ für HBsAg, HCV und HIV-Antikörper sind. Da kein bekanntes Verfahren mit absoluter Sicherheit garantieren kann, dass Produkte, die aus menschlichem Blut gewonnen werden, keine Infektion übertragen, müssen alle menschlichen Blutkomponenten in dieser Packung als potenziell infektiöses Serum oder Blut nach den Empfehlungen des CDC / NIH-Handbuchs "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988". (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors, 1988) gehandhabt werden.
2. Die TMB-Substratlösung ist für die Haut und die Schleimhäute ein Reizstoff. Vermeiden Sie direkten Kontakt.
3. Alle Komponenten dieser Packung wurden kalibriert und getestet. Es ist nicht empfehlenswert Komponenten aus unterschiedlichen Chargen zu mischen, da sich dies auf die Ergebnisse auswirken könnte.
4. Verdünnte Schwefelsäure (1M H₂SO₄) ist ein Reizstoff für die Augen und die Haut. Bei Berührung mit den Augen spülen Sie diese sofort mit Wasser aus und suchen Sie einen Arzt auf.

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

1. Alle gelieferten Reagenzien sollten bei 2-8°C gelagert werden. Die ungeöffneten Reagenzien Fläschchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum auf der Verpackung haltbar. Kontakt von ursprünglich verschlossenen oder versiegelten Bestandteilen mit der Umgebungstemperatur führt nach ein paar Stunden nicht zu Schäden an den Reagenzien. **NICHT EINFRIEREN!**
2. Sobald die Packung geöffnet ist, beträgt die Haltbarkeit 90 Tage.
3. Nicht verwendete Streifen müssen im Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel durch Einrollen der offenen Enden und Klebeband über die gesamte Länge der Öffnung versiegelt werden.
4. Kristalle können sich in dem 20x konzentriertem Waschpuffer während der Kühlung bilden. Dies ist

völlig normal. Lösen Sie die Kristalle durch Erwärmen des Puffers bei 37°C vor der Verdünnung auf. Nach der Verdünnung kann die Lösung bei 2-8°C bis einundzwanzig Tage gelagert werden.

Serum-Gewinnung

Bereiten Sie Seren von aseptisch entnommenen Proben unter Verwendung von Standardverfahren vor. Hitze inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden. Partikelmaterial und Ausscheidungen in Seren können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Verwendung von lipämischen, trüben oder kontaminierten Seren wird nicht empfohlen. Derartige Proben sollten durch Zentrifugieren oder Filtern vor dem Test gereinigt werden.

Lagerung der Proben

Die Proben sollten bei 2-8°C gelagert und innerhalb von 7 Tagen getestet werden (die Zugabe von 0,1% Natriumazid wird dringend empfohlen). Wenn eine längere Lagerung zu erwarten ist, aliquotieren und lagern Sie die Proben bei -20°C. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

Manuelles Test-Verfahren

A. Vorbereitung der Reagenzien

1. Bringen Sie alle Komponenten und die klinischen Proben, die getestet werden sollen, auf Raumtemperatur. Mischen Sie vor dem Gebrauch vorsichtig die Kalibratoren (C30, C60, C120), die negative und positive Kontrollen und die klinischen Proben.
2. Bestimmen Sie die Gesamtanzahl der zu testenden Proben. Zusätzlich zu den Proben muss das Folgende in jedem Test enthalten sein: Drei Kalibratoren (C30, C60, C120) und eine negative Kontrolle. Die positive Kontrolle kann optional mitgeführt werden.
3. Entnehmen Sie die Mikrotiterplatte aus dem Aluminiumbeutel, indem Sie ein Ende in der Nähe der Versiegelung abschneiden. Lassen Sie die erforderliche Anzahl von Streifen (entsprechend der Anzahl der zu testenden Proben) in der Verpackung. Nicht verwendete Streifen müssen im Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel durch Einrollen der offenen Enden und Klebeband über die gesamte Länge der Öffnung versiegelt werden.
4. Verdünnen Sie den konzentrierten Waschpuffer 1/20 mit doppelt-deionisiertem oder destilliertem Wasser. Beispiel: um einen Liter Waschpuffer vorzubereiten, fügen Sie 50 ml des konzentrierten Waschpuffers zu 950ml doppelt-deionisiertem oder destilliertem Wasser hinzu.

B. Inkubation von Serumproben und Kontrollen

5. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1/101 mit der mitgelieferten Serumverdünnung wie folgt: Fügen Sie 10 µl Patientenserum zu 1000 µl Serumverdünnungsmittel hinzu.
6. Verteilen Sie 100 µl von den drei Kalibratoren (C30, C60, C120), die Negativ- und Positiv-Kontrollen und Serumproben in separate Vertiefungen der Teststreifen.
7. Decken Sie die Streifen mit einer Abdeckfolie ab und inkubieren Sie diese für 1 Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer.
8. Entleeren Sie die Flüssigkeit aus den Vertiefungen.

9. Waschschritte:

Manuelle Wäsche:

Füllen Sie jede Vertiefung mit Waschpuffer auf und entleeren Sie die Flüssigkeit, Wiederholen Sie diesen Schritt für insgesamt 5 Waschvorgänge.

Automatische Wäsche:

Füllen Sie jede Vertiefung mit 350 µl Waschpuffer auf und entleeren Sie die Flüssigkeit. Wiederholen Sie diesen Schritt für insgesamt 5 Waschvorgänge.

10. Trocknen Sie die Streifen und Rahmen durch leichtes Abklopfen mit sauberem, saugfähigem Papier.

C. Inkubation mit Konjugat

11. Geben Sie je 100 µl des gebrauchsfertigen HRP-Konjugats in jede Vertiefung.
12. Decken Sie die Streifen mit einer Abdeckfolie ab und inkubieren Sie diese für 1 Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer.
13. Entleeren Sie die Flüssigkeit und führen Sie den Waschvorgang wie in den Schritten 9-10 beschrieben durch.

D. Inkubation mit TMB Substrat

14. Decken Sie die Streifen mit einem Deckel oder Abdeckfolie ab und inkubieren Sie diese bei Raumtemperatur für **15 Minuten**.
15. Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 100 µl der Stopplösung (1M H₂SO₄) in jede Vertiefung.

E. Bestimmung der Ergebnisse

16. Bestimmen Sie die Absorption bei 450/620nm und dokumentieren Sie die Ergebnisse. Die Bestimmung sollte nicht mehr als 30 Minuten nach Stoppen der Farbreaktion erfolgen.
 - **Hinweis:** Etwaige Luftblasen sollten vor dem Lesen entfernt werden. Der Boden der ELISA-Platte sollte sorgfältig gereinigt werden.

Testverfahren für die automatisierte Verwendung

Das Volumen der Fläschchen und Reagenzien wurde für die automatisierte Verwendung angepasst.

A. Vorbereitung der Reagenzien

1. Bringen Sie alle Komponenten und die klinischen Proben, die getestet werden sollen, auf Raumtemperatur. Mischen Sie vor dem Gebrauch vorsichtig die Kalibratoren (C30, C60, C120), die Negativ- und Positiv-Kontrollen und die klinischen Proben.
2. Bestimmen Sie die Gesamtanzahl der zu testenden Proben. Zusätzlich zu den Proben muss Folgendes in jedem Test enthalten sein: Drei Kalibratoren (C30, C60, C120) und eine negative Kontrolle. Die positive Kontrolle kann optional mitgeführt werden.
3. Entnehmen Sie die Mikrotiterplatte aus dem Aluminiumbeutel, indem Sie ein Ende in der Nähe der Versiegelung abschneiden. Lassen Sie die erforderliche Anzahl von Streifen (entsprechend der Anzahl der zu testenden Proben) in der Verpackung.
4. Verdünnen Sie den konzentrierten Waschpuffer 1/20 mit doppelt-deionisiertem oder destilliertem Wasser. Beispiel: um einen Liter Waschpuffer vorzubereiten, fügen Sie 50 ml des konzentrierten Waschpuffers zu 950ml doppelt-deionisiertem oder destilliertem Wasser hinzu.

B. Inkubation von Serumproben und Kontrollen

5. Verdünnen Sie jedes Patientenserum wie folgt 1/101:

- Geben Sie 750 µl Serumverdünnungsmittel in jedes Probenröhrchen.
- Saugen Sie 250 µl Serumverdünnungsmittel und 10 µl Patientenserum ab.
- Fügen Sie 260 µl (1:26 vorverdünnte Proben) zu jedem Probenröhrchen hinzu (Endvolumen von 1010 µl in jedem Probenröhrchen).

6. Verteilen Sie je 100 µl der Negative- und Positive-Kontrolle, die drei Kalibratoren (C30, C60, C120) und 1:101 der verdünnten Serumproben in separate Vertiefungen der Teststreifen.
7. Inkubieren Sie die Proben für 25 Minuten bei Raumtemperatur (22-28°C). Die Inkubationszeit wird ab dem Punkt gemessen, an dem Sie das erste Röhrchen füllen, wie im Automatisierungsprogramm angegeben: "Inkubationszeit vom Beginn der vorherigen Analyseschritte". Nach der Inkubation bei 22-28°C inkubieren Sie die Proben für weitere 35 Minuten bei 35°C.
8. *Eliminieren Sie den Assay-Drift, der von diesem Vorgang verursacht wird.*
9. **Waschschritt:** Führen Sie 5 X 500 µl Waschzyklen mit Savyon Waschpuffer durch.
10. Führen Sie 2 Absaugzyklen durch, um die restliche Flüssigkeit aus dem Fläschchen zu entfernen, wie im Automatisierungsprogramm beschrieben: "Führen Sie 2 Absaugzyklen aber keinen Punktatdurchlauf durch. Partiieller Plattenmodus: Halten Sie die volle Plattenzeit ein"

C. Inkubation mit Konjugat

Jedes Fläschchen mit HRP-Konjugat kann nur zweimal verwendet werden

11. Geben Sie je 100 µl des gebrauchsfertigen HRP-Konjugats in jede Vertiefung.
12. Die Inkubationszeit wird ab dem Punkt gemessen, an dem Sie das erste Röhrchen füllen, wie im Automatisierungsprogramm angegeben: "Inkubationszeit vom Beginn der vorherigen Analyseschritte". Nach der Inkubation bei 22-28°C inkubieren Sie die Proben für weitere 35 Minuten bei 35°C.
13. Führen Sie den Waschvorgang wie in den Schritten 9-10 beschrieben durch.

D. Inkubation mit TMB – Substrat

14. Geben Sie je 100 µl des gebrauchsfertigen TMB-Substrats in jede Vertiefung und inkubieren Sie diese bei Raumtemperatur (22-28°C) für **15 Minuten im Dunklen**. Die Inkubationszeit wird ab dem Punkt gemessen, an dem Sie das erste Röhrchen füllen, wie im Automatisierungsprogramm angegeben: "Inkubationszeit vom Beginn der vorherigen Analyseschritte".
15. Stoppen Sie die Reaktion durch Hinzufügen einer 100µl Stopplösung (1M H₂SO₄) in jede Vertiefung.

E. Bestimmung der Ergebnisse

16. Bestimmen Sie die Absorption bei 450/620nm und dokumentieren Sie die Ergebnisse. Die Bestimmung sollte nicht mehr als 30 Minuten nach Stoppen der Farbreaktion erfolgen.

Bitte beachten Sie, dass jede Automatisierungsmaschine spezifische technische Befehle hat. Bitte wenden Sie das

Savyon Automatisierungsverfahren für diesen Assay beim Betrieb Ihrer Automatisierungsmaschine an.

Testauswertung

Folgende Qualitäts-Kriterien müssen erfüllt werden, damit der Test gültig ist. Wenn diese Kriterien nicht erfüllt werden, sollte der Test als ungültig betrachtet werden und dieser sollte wiederholt werden.

1. C120: OD \geq 1.3
C60: OD \geq 0.9
C30: OD \geq 0.5
2. Verhältnis OD C120 / OD C60: $>$ 1.3
3. Verhältnis OD C60 / OD C30: $>$ 1.3
4. **Optional:** Positive Kontrolle: $>$ 100 IU/ml ((siehe Kapitel - Kalkulation und Interpretation der Testergebnisse).
5. Negative Kontrolle: $<$ 15 IU/ml (siehe Kapitel – Kalkulation und Interpretation der Testergebnisse)

Kalkulation der Testergebnisse


BITTE; VERWENDEN SIE „MASTER INTERPREATION FOR SeroPT“-FILE (IN BEIGEFÜGTEN CD ANSCHAUEN) ZUR SCHNELLER KALKULATION DER ERGEBNISSE:

KALKULATION DER ERGEBNISSE KANN AUCH WIE UNTEN ANGEFÜHRT DURCHGEFÜHRT WERDEN:

1. Manuelle Methode durch Verwendung eines Millimeterpapiers mit Quadraten:

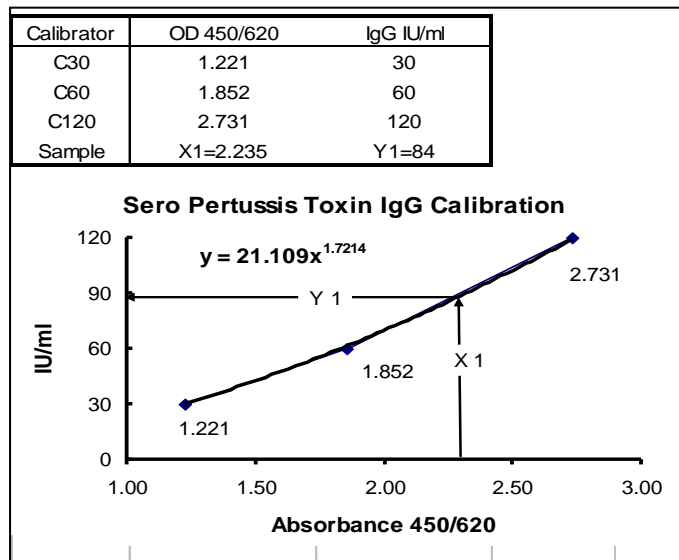
- i. Zeichnen Sie die Absorptionwerte (OD) der 3 Kalibratoren (C30, C60 und C120) auf der X-Achse im Vergleich zu ihrer Konzentration (IU / ml) auf der Y-Achse auf.
- ii. Fügen Sie die Konzentration der untersuchten Testwerte (in IU / ml) von jeder gemessenen Absorption durch Verwendung der Standardkurve ein (siehe Beispiel 1).

2. Computerisierte Methode mit MS-Excel:

- i. Öffnen Sie ein MS-Excel Datenblatt
- ii. Geben Sie in der Spalte B die Werte der drei Kalibratoren (30, 60, 120) untereinander ein und fügen Sie in der Spalte A die entsprechenden OD Werte hinzu.
- iii. Klicken Sie auf das Grafiksymbol () und wählen Sie das Streudiagramm, Werten Sie Spalte B gegenüber Spalte A aus.
- iv. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf eines der Grafiksymbole und wählen Sie "Add Trendline...").
- v. Wählen Sie unter dem Kartenreiter "Type" den Kartenreiter "Power" und unter "Options" wählen Sie "Display equation on chart". Klicken Sie auf die OK Schaltfläche.
- vi. Es wird eine Gleichung in der Form $Y = aX^b$ angezeigt, wobei Y der PT-Konzentration in IU / ml und X OD_{450/620}. entspricht. Verwenden Sie diese Gleichung, um die PT-Konzentration nach den OD-Werten für jede vorliegende Probe zu berechnen (siehe Beispiel 1).

Beispiel 1. Interpolation der Ergebnisse:

Lesen Sie den Absorptionswert der Probe (X1) ab und markieren Sie diesen auf der X-Achse. Zeichnen Sie eine vertikale Linie von diesem Punkt zur Kalibrierkurve und von dem Achsenabschnitt eine waagerechte Linie zur Y-Achse. Lesen Sie die Konzentration IU/ml der Probe ab.



Excel: (Y) =21.109*2.235^1.7214

Interpretation der Testergebnisse

1. **Gültigkeit der Probenergebnisse:** Wenn OD_{450/620} einer bestimmten Probe \geq 3.0 ist, ist es empfehlenswert die Probe nochmals mit einer Verdünnung von 1:404 zu testen. Das Ergebnis in IU / ml dieser speziellen Probe sollte dann mit dem Faktor 4 multipliziert werden.
2. **Cut-off:** Nach rezenten Berichten und Empfehlungen von Referenzlaboratorien in der EU (16,17), empfiehlt Savyon Diagnostics die folgende Interpretation der Ergebnisse:

IgG IU/ml	Resultat	Interpretation
$<$ 40 IU/ml	Negativ	Keine Hinweise auf eine akute Infektion
\geq 40 to $<$ 100 IU/ml	Grenzwertig	Mögliche Infektion, IgG in 2-4 Wochen erneut testen oder den IgA-Level testen
\geq 100 IU/ml	Positiv	Indikation für eine akute Infektion oder rezenten Kontakt

3. **Testen der Proben von Rekonvaleszenten:** Wenn die Diagnose nicht mit Sicherheit von einem einzigen Serum (grenzwertiger Bereich) erstellt werden kann, empfiehlt Savyon Diagnostics einen erneuten Test mit einer zweiten (Rekonvaleszenten) Serumprobe nach 2-4 Wochen (15,16). Die neuere Fachliteratur empfiehlt, dass \geq 2-fache Veränderung der IgG-Werte Indikativ für eine rezente akute Infektion (15) ist.
4. **IgA Tests und Antikörper-Profilung:** Im Falle einer Nicht-Verfügbarkeit einer zweiten Serumprobe und um einen umfassenden Antikörperprofil zu erstellen, empfiehlt Savyon Diagnostics auch die IgA-Level (15,16) zu testen:

IgG	IgA	Interpretation
Negativ	Negativ	Kein Hinweis auf <i>B. Pertussis</i> Infektion (siehe Test Einschränkungen)
Grenzwertig	Negativ	Kein rezenter Infektion
Grenzwertig oder Negativ	Positiv	Anzeichen für eine rezente Infektion
Positiv	Negativ oder Positiv	Anzeichen für eine rezente Infektion

Einschränkungen des Testverfahrens

1. Es sollte kein einziger serologischer Test zur endgültigen Diagnose verwendet werden. Alle klinischen Daten und Labordaten müssen berücksichtigt werden.
2. Zu früh entnommene Proben während der primären Infektion können keine nachweisbaren Antikörper enthalten. Wenn ein Verdacht auf *B. Pertussis* besteht, sollte eine zweite Probe nach 2-4 Wochen genommen und parallel mit der ursprünglichen Probe getestet werden.
3. Wenn bei Säuglingen unter dem Alter von 6 Monaten eine Infektion vermutet wird, sollte ein weiterer Test durchgeführt (Kultur, PCR) werden, da Kinder, die jünger als 6 Monate sind, selten Antikörper entwickeln.
4. Es muss keine serologische Diagnose für eine *B. Pertussis* Infektion durchgeführt, wenn die Impfung vor weniger als 1 Jahr erfolgte.

Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Präzision:

Probe	Anzahl der Replikate	Mittlerer OD Wert	CV%
120IU/m	10	119	3.5
30IU/ml	10	32	7.1

Intra-Assay Präzision:

Probe	Anzahl der Replikate	Mittlerer OD Wert	CV%
120IU/ml	10	122	6.3
30IU/ml	10	30	9.4

Bibliographie

1. Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly epidemiological record; No. 40; 2010, 85: 385-400; www.who.int/wer.
2. Tan T, Trindade E, Skowronski D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24; 2005, 10-18.
3. Munoz FM. Pertussis in infants, children, and adolescents: diagnosis, treatment, and prevention. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 17; 2006, 14-19.
4. Mattoo S. & Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies; *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18:362-82.
5. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J. for the Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF;

Global regional and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis; *Lancet.* 2010; 375: 1969-1987.

6. Zepp F, Heining U, Mertsola J, Bernatowska E, Guiso N, Roord J, Tozzi AE, Van Damme P. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe; *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11: 557-70.
7. Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, Englund JA. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatric Infectious Disease Journal*; 2005, 24 (Suppl. 5): S58-S61.
8. The Global Pertussis Initiative Meeting report from the Fourth Regional Roundtable Meeting, France, April 14-15; *Human Vaccines.* 2010; 7:4, 481-488.
9. Srugo I, Benilevi D, Madeb R, Shapiro S, Shohat T, Somekh E, Rimmer Y, Gershtein V, Gershtein R, Marva E, Lahat N. Pertussis Infection in Fully Vaccinated Children in Day-Care Centers, Israel; *Emerging Infectious Diseases.* 2000; Vol. 6, No. 5 September-Oct.
10. HPA Guidelines for the Public Health Management of Pertussis. www.hpa.org.uk. October 2012.
11. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N; Pertussis PCR Consensus Group. nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(10): 4925-9.
12. ECDC TECHNICAL DOCUMENT; Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*; Version 1.0, September 2012.
13. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, Wirsing von König CH; EU Pertstrain group EU Pertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30: 307-312.
14. André P, Caro V, Njamkepo E, Wendelboe AM, Van Rie A, Guiso N Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose *Bordetella pertussis* infection in 2007. *J Clin Microbiol*; 2008, 46(5):1672-1677
15. Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J, Wirsing von König CH. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Bordetella pertussis*. *J. Clin. Micro.* 2010; 48(12); 4459-4463.
16. Xing D, Markey K, Newland P, Rigsby P, Hockley J, He Q. EUVAC. NET collaborative study: evaluation and standardization of serology for diagnosis of pertussis. *J. Immunol. Methods.* 2011; 372(1-2): 137-45.
17. Xing D, Wirsing von König CH, Newland P, Riffelmann M, Meade BD, Corbel M, Gaines-Das R. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(3): 303-311.



European Authorized Representative: Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels, Belgium

Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

	Temperaturbegrenzung
	Lesen Sie die Gebrauchsanweisungen
	In-Vitro-Diagnosesystem
	Hersteller
	Europäischer Handlungsbevollmächtigter