

Aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Vergleich kommerzieller Immunoassay-Systeme zum Nachweis von
Antikörpern gegen Antigene von *Bordetella pertussis*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Karsten Thiel

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Wirsing von König

Zweitgutachterin: PD. Dr. med. Grandoch

Meinen Eltern

In Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

M. Riffelmann, K. Thiel, J. Schmetz, C.H. Wirsing von Koenig: Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. J. Clin. Microbiol. 2010; 12: 4459-4463

Die Experimente wurden zwischen Januar und November 2009 durchgeführt

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	4
1.2. Problematik und Zielsetzung	7
3. Material und Methoden	10
3.1. Serumpanel	12
3.1.1. Referenzpräparationen	12
3.1.2. Patientenseren	13
3.2. ELISA Testsysteme	15
3.4. Statistische Auswertung	19
4. Ergebnisse	20
4.1. Ergebnisse der Referenzpräparationen	20
4.2. Verdünnungsexakte und Positionseffekte	27
4.3. Intra-assay Variationen	29
4.4. Ergebnisse der Patientenseren	30
5. Diskussion	33
7. Literaturverzeichnis	38
Abkürzungsverzeichnis.....	42
Abbildungsverzeichnis	43
Tabellenverzeichnis	44
Anhang:	45

1. Einleitung

Keuchhusten ist eine durch *Bordetella pertussis* und selten durch *B. parapertussis* hervorgerufene Infektionskrankheit. Durch Husten werden bakterienhaltige Tröpfchen übertragen, wobei die Infektionsdosis mit etwa 100 CFU recht gering ist. Die Bakterien befinden sich als erstes im Nasopharynx, die Vermehrung von *B. pertussis* und *B. parapertussis* erfolgt dann auf dem zilienträgenden Epithel der tieferen Atemwegsschleimhäute. Ein lang dauernder asymptomatischer Trägerstatus bei Gesunden ist nicht bekannt. Eine Infektion mit *B. pertussis* sichert nur für etwa 3,5–12 Jahre einen Schutz vor einer Reinfektion, wobei diese, abhängig von vielen Faktoren als „grippaler“ Infekt der oberen Atemwege, als lang dauernder quälender Husten, oder als „klassischer“ Keuchhusten mit allen Symptomen ablaufen kann. Diese „klassische“ Symptomatik der Pertussis wird in drei Abschnitte unterteilt:

- Das „Stadium catarrhale“ beginnt mit allgemeinen Symptomen einer Infektion der oberen Atemwege, wie Rhinorrhoe, aber meist ohne Fieber. In diesem Stadium ist die Ansteckungsfähigkeit besonders groß (Dauer ca. 1 bis 2 Wochen)
- Im zweiten „Stadium convulsivum“ wird das Vollbild des Keuchhustens mit paroxysmalen, evtl. mehrfach aufeinander folgenden, stakkatoartigen Hustenattacken (besonders nachts), inspiratorischem Einziehen am Ende der Attacken, und Würgen und Erbrechen beobachtet. (Dauer im Mittel 3-6 Wochen, gelegentlich auch länger).
- Im dritten „Stadium decrementi“ nimmt die Intensität und Frequenz der Hustenattacken langsam ab (Dauer im Mittel 2-6 Wochen, bis zu 10 Wochen möglich).

Bei Neugeborenen und jungen Säuglingen fehlen teils die typischen Hustenattacken, unspezifische respiratorische Symptome und vor allem Apnoen sind dagegen häufig, wobei schwere Komplikationen wie Apnoen, Enzephalopathien und Pneumonien vor allem bei Säuglingen gesehen werden. Bei unter 6 Monate alten stationär behandelten Säuglingen wurde in 75 %

eine Pneumonie, in 25 % eine beatmungspflichtige Apnoe, in 14 % Krampfanfälle und in 5 % eine Enzephalopathie diagnostiziert. Pro Jahr werden in Deutschland etwa 1–2 Todesfälle gemeldet [1,2,3,4]

B.pertussis produziert eine Reihe von biologisch aktiven Substanzen, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind [4]. Der wichtigste Virulenzfaktor ist das Pertussis Toxin (PT), das analog zu anderen bakteriellen Toxinen nach dem A-B-Modell aufgebaut ist [4]. Das Filament-Hämagglutinin (FHA) und die Fimbrien (FIM) sind, wie wahrscheinlich auch das Pertactin (PRN) an der Adhäsion der Bakterien im respiratorischen Epithel beteiligt. Daneben besitzen die Bakterien weitere Virulenzfaktoren, wie Adenylatcyclase-Hämoylsin, dermonekrotisches Toxin, Trachea-Cytotoxin und, wie alle Gram-negativen Bakterien, Lipopolysaccharide in der Zellwand [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Pertussis zeigt eine hohe Übertragungshäufigkeit (es wurden Infektionsraten von über 90% bei nicht geimpften Haushaltsangehörigen gefunden).

Schulkinder, die nicht mehr ausreichenden Immunschutz haben, Jugendliche und Erwachsene können leicht Säuglinge und jüngere Kinder ungeimpfte anstecken [11, 12, 13, 14]. Neben *B.pertussis* und *B. parapertussis* können auch andere Erreger pertussiforme Symptome verursachen, so z. B. Adenoviren, Respiratory Syncytial Viren, humane Parainfluenzaviren, Influenzavirus B, *Mycoplasma pneumoniae*, Rhinoviren. Infektionen mit mehr als einem Erreger sind nicht selten, Doppelinfectionen mit RSV und *B.pertussis* werden häufig bei Säuglingen gefunden [4].

Durch die breite Anwendung zunächst der Ganzzell-Pertussis-Impfstoffe und seit etwa 20 Jahren auch der azellulären Impfstoffe wurde eine deutliche Verminderung der Inzidenz und der Todesfälle bei Keuchhusten erreicht. Erkrankten früher vor allem Kleinkinder und Säuglinge konzentrieren sich die Fälle mittlerweile im jungen Säuglingsalter, bei älteren Kindern, bei Jugendlichen und bei Erwachsenen. [15, 16]

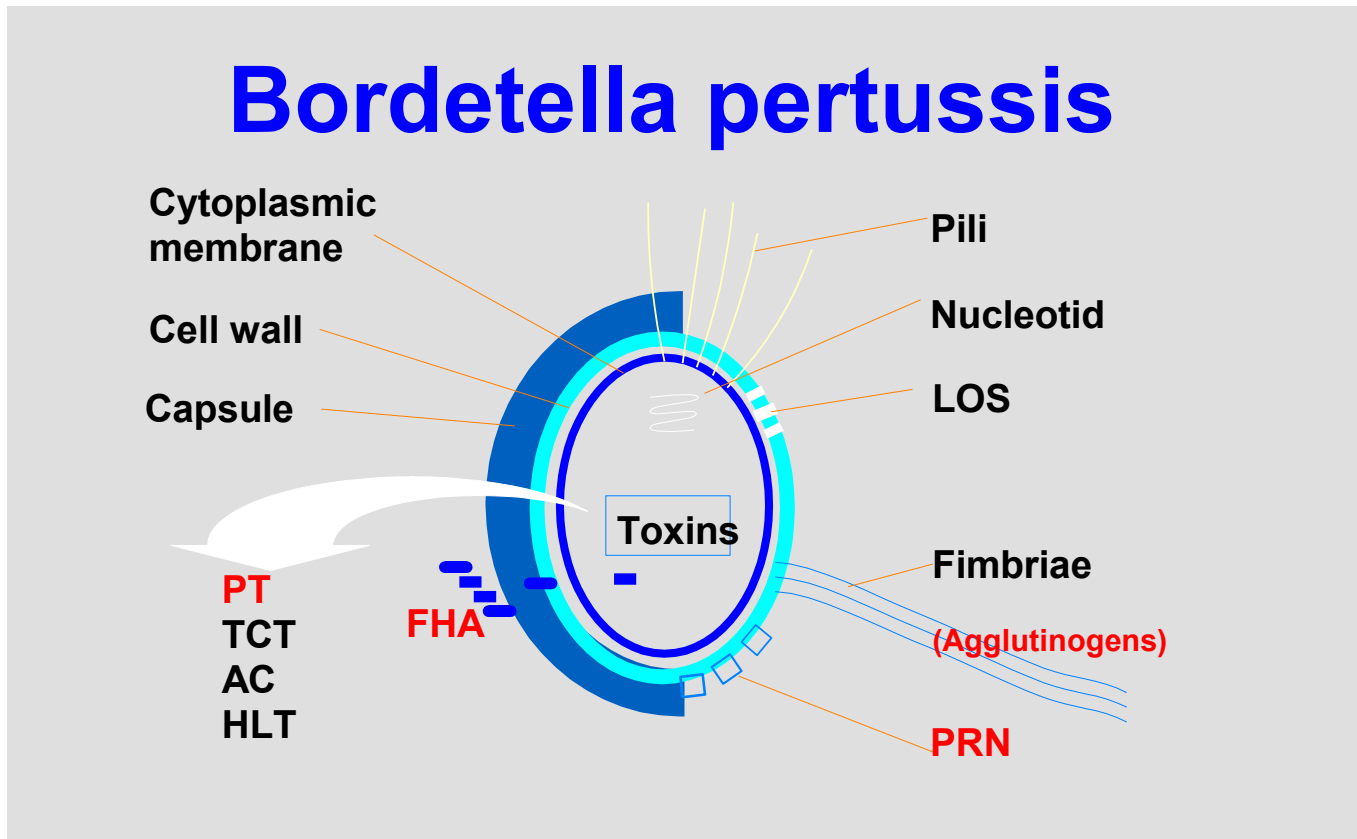
Nach Infektion und nach Impfung entwickelt sich eine Immunreaktion gegen Antigene von *B.pertussis*. Die Entwicklung der Antikörper gegen *B.pertussis* während einer Keuchhustenerkrankung zeigt eine relativ lange serologisch

negative Phase mit bereits bestehender Symptomatik, gefolgt von einem schnellen Anstieg von zuerst IgA- und anschließend IgG-Antikörpern. Nach Impfung kommt es gleichfalls zur Bildung von Antikörpern gegen die im Impfstoff enthaltenen Antigene [18,19,20,21].

Serologische Methoden zur Quantifizierung der Antikörperkonzentration im Serum gegen Antigene von *B.pertussis* werden vor allem eingesetzt, um die Erkrankung zu diagnostizieren, aber auch in Studien zur Immunogenität der Pertussis-Impfstoffe, zur Rolle der transplazentar übertragenen mütterliche Antikörper und für seroepidemiologische Datensammlungen verwendet. Als serologische Methodik wurde vor mehr als hundert Jahren die Agglutinationsreaktion beschrieben, etwas später konnten Antikörper mittels Komplementbindungsreaktion, mit indirekter Immunfluoreszenz und passiver Hämagglutination und mittels Immunoblots nachgewiesen werden. Seit den 1990er Jahren haben sich Immunoassays mit mehr oder minder gereinigten Antigenen durchgesetzt, von denen ELISAs und durchflußcytometrische Verfahren [12] mit gereinigtem PT von den EU-Referenzlaboratorien als sinnvolle Verfahren empfohlen werden [23].

Abbildung 1: Schematische Darstellung von *B. pertussis* sowie der wichtigsten Virulenzfaktoren

(Abbildung: Prof. Dr. H.J. Schmitt, Nierstein)



1.2. Problematik und Zielsetzung

Wegen der vielfach nicht eindeutigen klinischen Symptome muss die Pertussis durch Laborverfahren diagnostiziert werden. Der Direktnachweis der Bakterien bzw. ihrer DNA kann durch Kultur bzw. PCR aus nasopharyngealen Sekreten oder Abstrichen erfolgen. Diese direkten Verfahren besitzen jedoch mit Ausnahme von ungeimpften jungen Säuglingen eine zu geringe Sensitivität (<5% - 20%). Daher werden die meisten Erkrankungen heute durch serologische Tests diagnostiziert. Die Diagnose wird hierbei in den meisten Fällen durch die Untersuchung einer einzelnen Serumprobe gestellt, und das Ergebnis in Bezug auf eine mehr oder minder gut definierte Normalpopulation interpretiert.

Insgesamt ist jedoch die serologische Diagnose bei Pertussis problematisch: IgG- und auch IgA-Antikörper gegen Antigene von *B.pertussis* sind bei einem Großteil der älteren Kinder, Jugendlichen und Erwachsenen nachweisbar, so dass lediglich ein signifikanter Anstieg der Antikörperkonzentration oder aber eine einmalig über einem altersentsprechend definierten Grenzwert („cut-off“) liegender Wert als Hinweis auf einen kürzlichen Kontakt gewertet werden kann. Alle Testverfahren arbeiten mit Antigenen, wie PT oder FHA, die gleichzeitig auch Bestandteil zugelassener Impfstoffe sind, so dass eine Impfantwort nicht von einer Infektion unterschieden werden kann. Kommerziell erhältliche Testsysteme benutzen unterschiedliche Antigene, so z.B. PT, FHA, oder Sonikate ganzer Bakterien, und somit unterschiedliche Interpretationen[21,24].

Eine Standardisierung der zur Diagnostik benutzten ELISA Systeme ist daher zwingend notwendig. Voraussetzung für die Standardisierung von solchen Testsystemen ist unter anderem ein international akzeptiertes Referenzpräparat (z.B. WHO Standard), welches die Einheiten definiert, in denen die gemessenen Antikörper angegeben werden [25]. Eine weitere Voraussetzung ist ein funktionierendes System der externen Qualitätskontrolle. Die im Auftrag der Bundesärztekammer durchgeführten externen Qualitätskontrollen der Bakterienserologie von INSTAND e.V. beinhalten seit einiger Zeit auch die *B.pertussis* Serologie [26]. Schließlich sind von Hersteller zu Hersteller vergleichbare und eindeutig interpretierbare Ergebnisse der Testsysteme notwendig.

Seit Januar 2009 steht ein WHO-Standard zur Verfügung [25], der gemeinsam mit dem Konsiliarlaboratorium für Bordetellen am HELIOS Klinikum Krefeld, des NIBSC und des CBER/FDA entwickelt und getestet wurde. Dieses Präparat wurde in 22 Laboratorien international evaluiert und mit Einheiten versehen, die analog zu den früher benutzten Einheiten des CBER/FDA Referenzpräparates gewählt wurden.

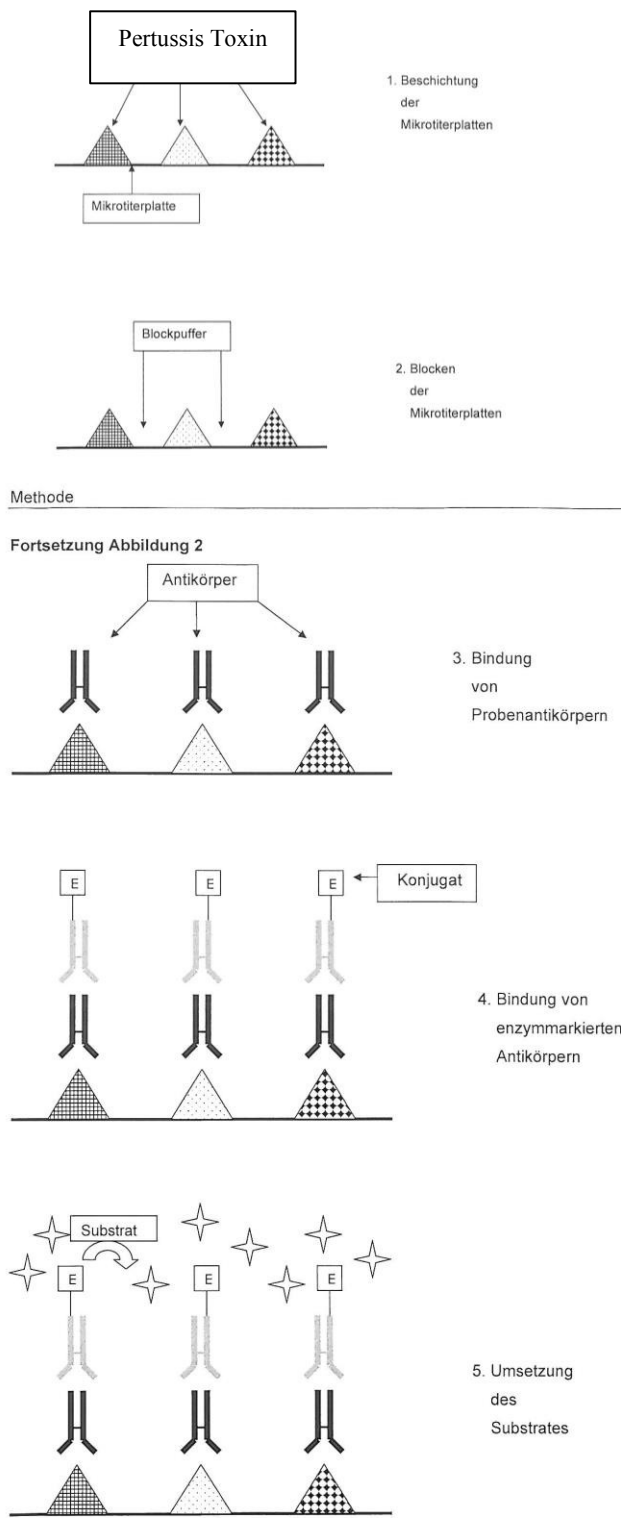
Ein erster Vergleich kommerziell erhältlicher ELISA-Systeme aus dem Jahr 2000 zeigte eine erhebliche Variabilität der Ergebnisse zwischen den Testkits und eine häufig unzureichende Spezifität und Sensitivität [24]. Andere Systeme, wie Immunoblots [27] und Multianalytssysteme [22] sind auf dem Markt verfügbar und wurden auf ihre Leistungsfähigkeit hin geprüft.

Das Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es daher, die im Jahre 2007 kommerziell erhältlichen serologischen ELISA-Testsysteme zur Messung von Antikörpern gegen Antigene von *B.pertussis* im Rahmen eines strukturierten Methodenvergleich gegen ein so genanntes in-house Verfahren zu validieren, die Robustheit und Vergleichbarkeit der ELISA zu untersuchen, und ihre diagnostische Interpretation mit den Ergebnissen des in-house ELISA zu korrelieren. Aus den Ergebnissen sollten dann Empfehlungen für die Anwendbarkeit dieser ELISA Systeme in der diagnostischen Praxis entwickelt werden.

3. Material und Methoden

Beim "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass die zu untersuchende Substanz (z.B. ein Antigen) an einer festen Oberfläche, die mit einem spezifischen Antikörper besetzt ist, gebunden und konzentriert wird. Danach wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der mit einem Enzym markiert ist, das für einen colorimetrischen Nachweis benutzt werden kann. Üblicherweise verwendet man alkalische Phosphatase oder Peroxidase (siehe Abb. 2).

Abbildung 2: Prinzip des ELISA zum Nachweis von Antikörper gegen Pertussis Toxin (PT)



3.1. Serumpanel

Zum Vergleich der kommerziellen ELISAs wurde ein Serumpanel erstellt, das es erlaubt eine Reihe gut charakterisierter Proben zu untersuchen:

3.1.1. Referenzpräparationen

1. Referenzpräparation der WHO: „1st International Standard of Pertussis Antibodies (Human)“ [25], dessen deklarierte Gehalte an Antikörpern in Tabelle 1 dargestellt sind. Diese Referenzpräparation wurde sowohl unverdünnt, als auch in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.
2. Sekundärer Standard des NIBSC/WHO bezogen auf den 1st International Standard of Pertussis antibodies (Human), dessen deklarierte Gehalte an Antikörpern gleichfalls in Tabelle 1 dargestellt sind. Diese Referenzpräparation wurde sowohl unverdünnt, als auch in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.
3. Referenzpräparationen (Poolseren) # 3, # 4 und # 5 der CBER/FDA, deren deklarierte Gehalte an Antikörpern gleichfalls in Tabelle 1 dargestellt sind. Die Präparation #4 hat deklarierte Gehalte nur bezüglich der Antikörper gegen Pertactin, die Gehalte an den anderen Antikörpern sind bekannt aber nicht deklariert. Daher wurde sie hier nicht eingesetzt. Die Präparation # 5 hat deklarierte Gehalte nur bezüglich der IgA-Antikörper, die Gehalte an den anderen Antikörpern sind bekannt jedoch ebenfalls nicht deklariert.
4. Ferner wurden alle positiven Kontrollen aus den getesteten ELISA Tests wurden in allen anderen ELISA Systemen mit untersucht.

3.1.2. Patientenseren

Die Nutzung von Restproben von Patientenseren erfolgte im Sinne einer Leistungsbewertung von diagnostischen Systemen, welche unter die Regelungen des Medizinproduktegesetzes fallen. Alle personenbezogenen Daten der diagnostischen Patientenproben wurden mit Ausnahme der mit den in-house ELISA's erzielten Ergebnissen entfernt.

Gleiches galt für die Restproben aus der Impfstoffstudie [28], wobei hier lediglich bekannt war, dass alle Probanden geimpft worden waren. Für die Verwendung der vollständig anonymisierten Restproben aus der Diagnostik war somit eine Einwilligungs- und Anzeigepflicht nach §24 MPG nicht gegeben, da keine invasive Probenentnahme ausschließlich für den Studienzweck erfolgte und kein zusätzliches Material ausschließlich für diese Studie entnommen wurde.

Die Restproben wurden in drei Panels unterteilt:

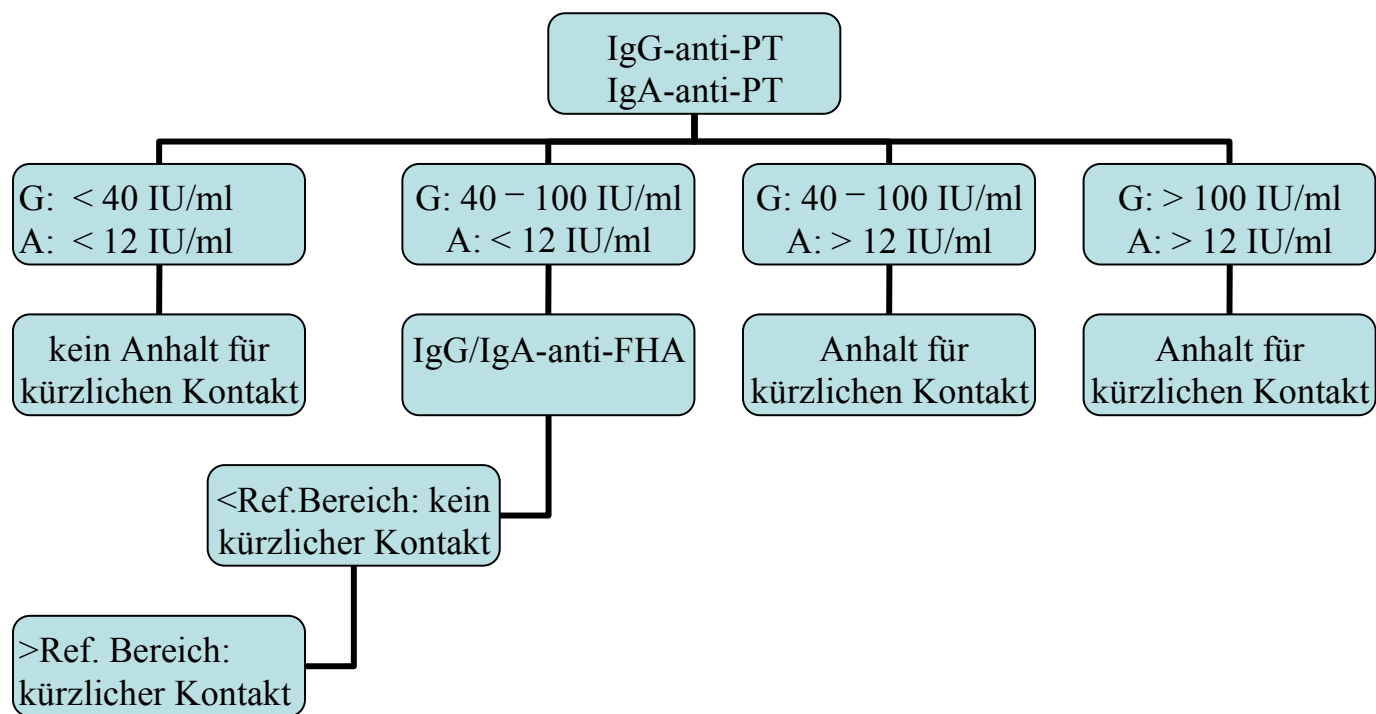
1. Seren von Patienten mit Antikörperkonzentrationen oberhalb der Referenzwerte entsprechend dem diagnostischen Algorithmus, der in Abbildung 3 (siehe Seite 14) dargestellt ist oder mit Titererhöhung zwischen Akut- und Konvalenzserum.
2. Seren von Patienten mit dem klinischen Verdacht auf Pertussis, bei denen dieser Verdacht jedoch nicht bestätigt wurde.
3. Serumproben von Adoleszenten nach Impfung mit einem azellulären Impfstoff [28]

Tabelle 1:**Deklarierte Antikörperkonzentration in den WHO/NIBSC**

Referenzpräparationen und den CBER/FDA Referenzseren (Angaben in IU/ml für die WHO Präparationen, Angaben in EU/ml für die Präparate des CBER/FDA)

	IgG-anti-PT	IgA-anti-PT	IgG-anti-FHA	IgA-anti-FHA
WHO Referenz: 1st International Standard (IU/ml)	335	65	130	65
NIBSC Working Reference (IU/ml)	106	18	122	86
CBER/FDA Reference Serum # 3 (EU/ml)	200	15	200	100
CBER/FDA Reference Serum # 5 (EU/ml)		140		280

Abbildung 3: Diagnostischer Algorithmus des Referenz-in-house ELISA



3.2. ELISA Testsysteme

Die Testkits wurden nach folgenden Kriterien bewertet: Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die Referenzpräparationen der WHO und des CBER/FDA. Vergleichbarkeit der quantitativen Werte und /oder der qualitativen Beurteilungskriterien in Bezug auf Patientenseren. Für die Beurteilung der Patientenseren wurden die nach dem oben beschriebenen Algorithmus mit einem in-house ELISA erzielten Ergebnisse als Referenz gewertet.

3.2.1 Kommerzielle ELISAs

Folgende ELISA Testkits wurden in die Studie aufgenommen:

1. EUROIMMUN Bordetella IgG

2. EUROIMMUN Bordetella IgA
3. Labor Dr. Merk und Kollegen, ELIMMUN IgG
4. Labor Dr. Merk und Kollegen, ELIMMUN IgA
5. MP Biomedicals Bordetella pertussis IgG
6. MP Biomedicals Bordetella pertussis IgA
7. Novatec NovaLisa Pertussis IgG
8. Novatec NovaLisa Pertussis IgA
9. Siemens Diagnostika, NOVAGNOST Bordetella pertussis IgG
10. Siemens Diagnostika, NOVAGNOST Bordetella pertussis IgA
11. Trinity Biotech, MarDx Bordetella pertussis EIA
12. Virion Serion Bordetella IgG
13. Virion Serion Bordetella IgA
14. Virion Serion Pertussis Toxin IgG
15. Virotech Pertussis Toxin IgG
16. Virotech Pertussis Toxin IgG
17. Virotech Bordetella IgG
18. Virotech Bordetella IgG
19. IBL Bordetella pertussis IgG
20. IBL Bordetella pertussis IgG

Die Zusammensetzung der Testkits ist in Tabelle 2 (siehe unten Seite 16) beschrieben.

Alle ELISA Systeme wurden nach den Vorschriften des Herstellers manuell durchgeführt. Zum Waschen der Mikrotiterplatten wurde ein Waschgerät TECAN Columbus nach den Vorschriften des Herstellers programmiert und verwendet. Die Platten wurden in einem ELISA Plattenleser der Fa. Molecular Devices bei der vorgeschriebenen Wellenlänge und, sofern verlangt, Referenzwellenlänge photometriert.

Sofern mehrere Kalibratoren in den Testkits enthalten waren, wurde eine quantitative Auswertung mittels der 4-Parameter-Logistik vorgenommen. War bei quantitativer Auswertung eine Einpunktkalibrierung vorgegeben, wurde die vom Hersteller angegebene Formel benutzt. Bei qualitativ

auszuwertenden Testkits wurde die qualitative Beurteilung aufgrund der Vorgabe des Herstellers vorgenommen.

Es wurden nur Resultate in die Auswertung einbezogen, bei denen die Kriterien des jeweiligen Herstellers bezüglich Validität der Ergebnisse erfüllt waren.

Tabelle 2: Testdaten der in dieser Studie untersuchten Assays

Hersteller	Verfahren	Antigen	Isotypen	Messgröße	Quant.
Euroimmun	PT ELISA	PT	IgG/IgA	FDA U/ml	Ja
Virotech	Pertussis ELISA	PT und FHA	IgG/IgA	Virotech E/ml	Ja
Virotech	PT ELISA	PT	IgG/IgA	Virotech E/ml	Ja
Dr. Merk und Kollegen	Pertussis ELISA	PT und FHA	IgG/IgA	FDA U/ml	Ja
Virion/Serion	Pertussis ELISA	PT und FHA	IgG/IgA	FDA U/ml	Ja
Virion/Serion	PT ELISA	PT	IgG	FDA U/ml	Ja
Trinity Biotech	Pertussis ELISA	PT und FHA	IgG, A, M gemeinsam	eigene U/ml	Ja
Siemens Novagnost	Pertussis ELISA	PT und FHA	IgG/IgA	eigene U/ml	Ja
Novatac	Pertussis ELISA	PT und FHA	IgG/IgA	Novatec E/ml	Ja
IBL	Pertussis ELISA	?	IgG/IgA	eigene U/ml	Ja
MP Biomedicals	Pertussis ELISA	?	IgG/IgA	?	?

? = nicht deklariert

3.2.2 In-House ELISA System

Der als Referenz benutzte in-house ELISA (Schema siehe Abbildung 2, Seite 10) ist ein "Sandwich-ELISA" bei dem die Festphase (U-Boden-Mikrotiterplatten) mit flüssigem PT der Fa. GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgien, beschichtet ist. Sind spezifische Antikörper in der zu untersuchenden Probe vorhanden, binden sie an PT. Nicht gebundene Serumbestandteile werden ausgewaschen. Anschließend wird ein zweiter Antikörper gegen menschliches IgG resp. menschliches IgA zugegeben (Quellen siehe unten), der mit den an PT gebundenen Antikörpern reagiert. Nicht gebundener Zweitantikörper wird erneut ausgewaschen. Die Aktivität des an den Zweitantikörper gebundenen Enzyms wird durch Zugabe von Substrat gemessen. Nach Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von NaOH wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen und der Gehalt an spezifischen Antikörpern im Vergleich zu einem Referenzpräparat in Internationalen Einheiten pro ml Serum (IU/ml) errechnet.

Die Standardarbeitsanleitung des in-house ELISA ist im Anhang detailliert beschrieben.

3.2.3. Ergebnisse/ Freigabekriterien

Bei jedem Ansatz wird zunächst eine Validierung der Ergebnisse von Standards und Kontrollen anhand der vorgegeben Kriterien durchgeführt. Die Reagenzkontrolle (Mittelwert) (Blank) (A1, B1) muss kleiner als 0,200 Extinktion sein.

Die Antikörperkontrolle (Mittelwert) (C1, D1) muss kleiner als 0,150 Extinktion sein.

Die Kurvenberechnung der Standardseren muss eine Kurvenanpassung von $r=1.00$ oder 0.99 erfüllen.

Ergibt sich eine Kurvenanpassung von $<0,99$ werden Werte des Standardserums, die laut Ausdruck als Ausreißer zu interpretieren sind, nicht zur Berechnung benutzt.

Die Ergebnisse der Kontrolle müssen in folgenden Bereichen liegen:

PT-IgG 106 EU/ml (Bereich: 94-118)

PT-IgA 20 EU/ml (Bereich: 13-31)

FHA-IgG 122 EU/ml (Bereich: 111-131)

FHA-IgA 85 EU/ml (Bereich: 71-106)

Ergebnisberechnung

Anhand der Standardkurve des Referenzserums wurde für jedes Serum ein Gehalt an Antikörpern gegen PT bzw. FHA in ELISA-Einheiten (EU) pro ml errechnet.

Keine Antikörper nachweisbar; < 2 EU/ml

Seren, die eine Extinktion kleiner als die Antikörperkontrolle aufwiesen, wurden als negativ bewertet (Befund: IgG- bzw. IgA-Antikörper gegen PT bzw. FHA < 2 EU/ml).

Seren, die eine berechnete Konzentration von weniger als 2 EU/ml aufwiesen, wurden als negativ bewertet.

Werte, die zur Berechnung nicht benutzt wurden:

Extinktionen, die oberhalb der höchsten Standardkonzentration liegen, wurden nicht zur Berechnung benutzt.

Extinktionen, die unterhalb des niedrigsten Standards liegen, wurden ebenfalls nicht zur Berechnung benutzt.

Aus den verbliebenen Werten in IU/ml wurde ein Mittelwert berechnet.

3.4. Statistische Auswertung

Zum Vergleich der mit den verschiedenen Testkits erhobenen Werte wurden aus den quantitativen Werten der IgG-anti-PT Antikörper lineare Regressionen mittels SigmaPlot Software erstellt (SPSS Science Software GmbH, Erkrath). Für die Güte der Übereinstimmung sind jeweils die Gleichungen der Regressionsgerade sowie der Regressionskoeffizient angegeben. Variationen in den Messwerten wurden mittels SIGMA-Stat Software berechnet.

4. Ergebnisse

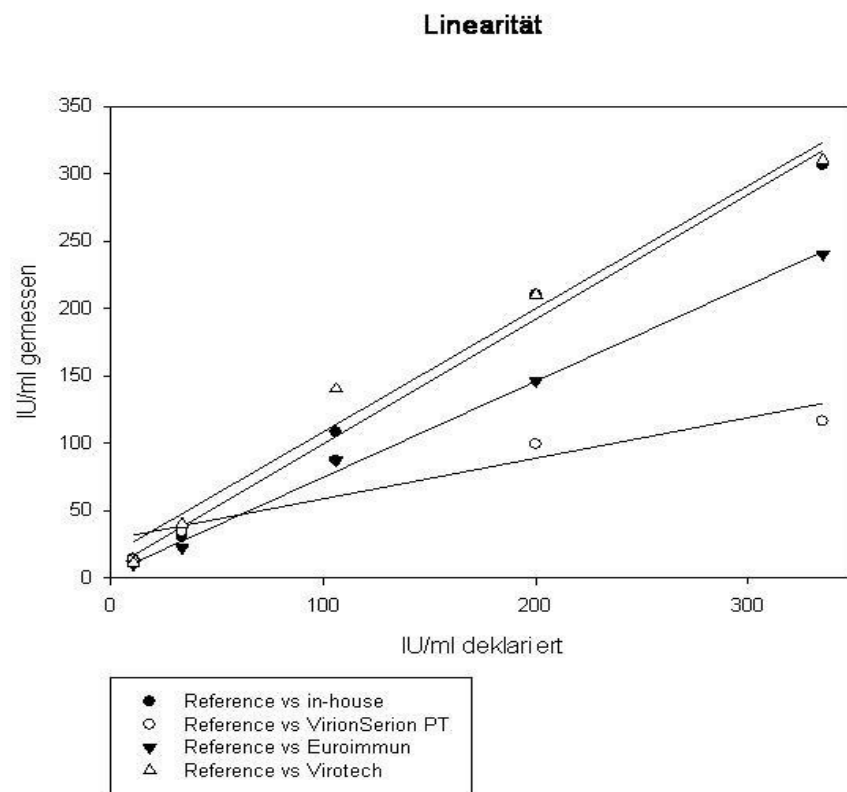
4.1. Ergebnisse der Referenzpräparationen

Alle Ergebnisse der Pertussis Serologie sollten ab 2009 in IU/ml angegeben werden, da ein WHO-Referenzpräparat vorliegt, welches die gleiche numerische Größenordnung verwendet wie das frühere Referenzpräparat der CBER/FDA [25]. Die Angabe in IU/ml setzt allerdings voraus, dass in den ELISA Systemen gereinigte Antigene und keine Mischantigene (z.B. PT und FHA) verwendet werden.

Abbildung 4 gibt somit die lineare Beziehung zwischen den erwarteten und den gemessenen Werte der IgG-anti-PT Antikörper wieder. Idealerweise sollte die Steigung der Regressionsgerade nahe an 1,0 sein und der Regressionskoeffizient, der die Summe der Abweichungsquadrate widerspiegelt, sollte gleichfalls nahe an 1,0 liegen.

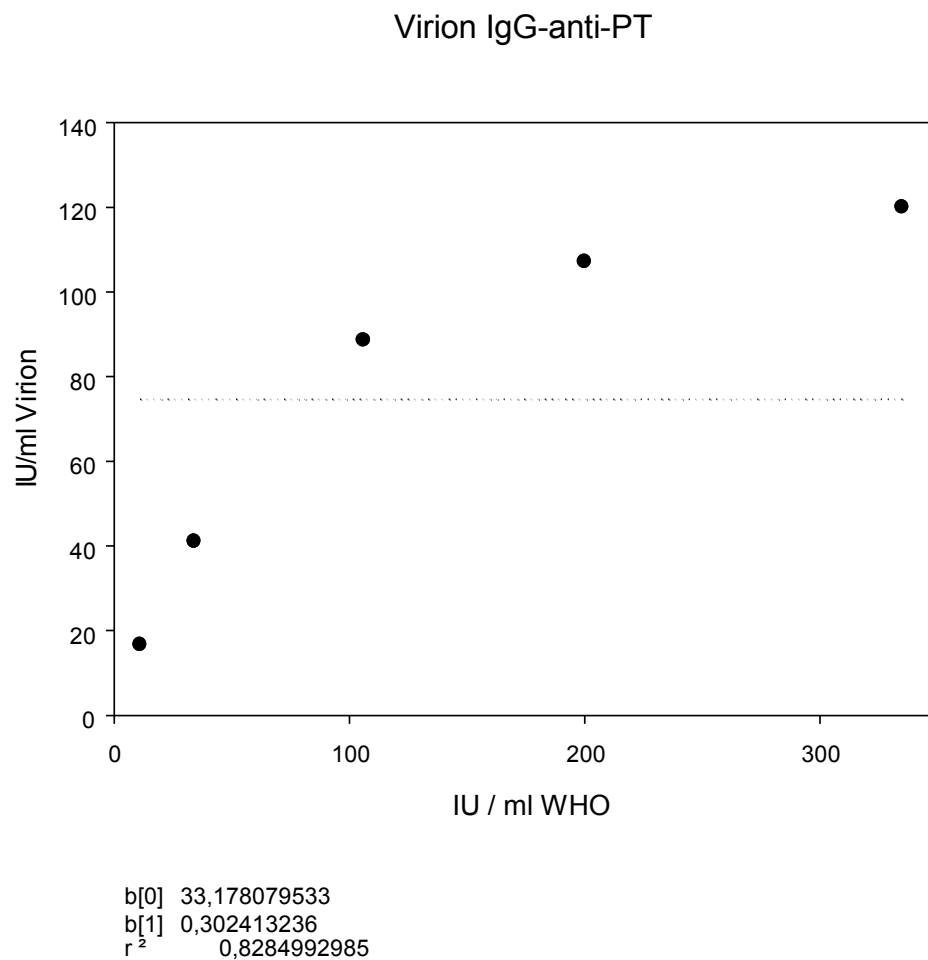
In Abbildung 4 sind daher nur solche ELISA Kits verglichen worden, die gereinigtes PT als Antigen verwenden und somit quantitative Angaben von Antikörpern gegen PT in IU/ml zulassen. Nicht alle Kits deklarierten die Ergebnisse in EU/ml oder IU/ml; für die Darstellung in Abbildung 4 wurden die gemessenen quantitativen Werte in IU/ml laut den Angaben der jeweiligen Herstellerfirma überführt. Abbildung 4 zeigt jedoch, dass nicht bei allen Kits eine lineare Beziehung zwischen den Werten der Referenzpräparationen und den gemessenen Werten des Kits bestand.

Abbildung 4: Lineare Regression der IgG-anti-PT in IU/ml von kommerziellen ELISA gegen einen in-house Referenz-ELISA



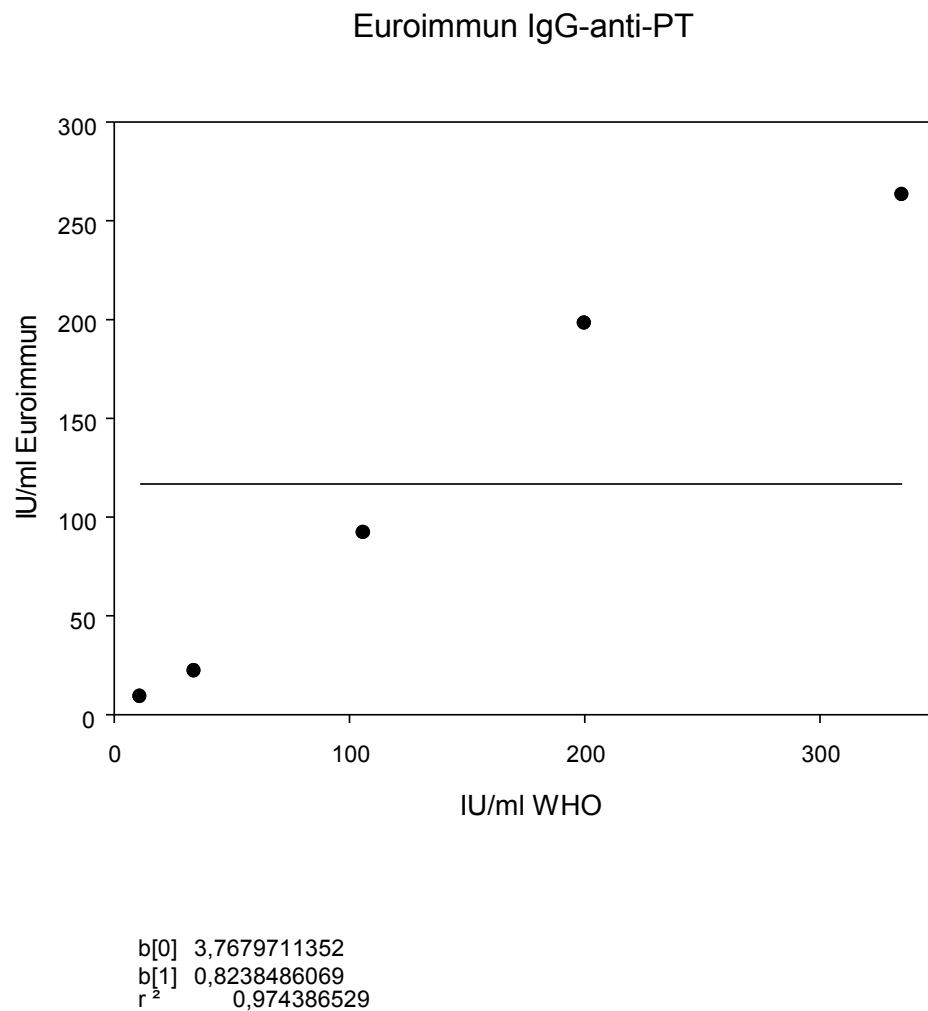
Um die gefundenen Abweichungen besser beurteilen zu können, ergaben sich im Einzelnen die in den folgenden Abbildungen für die untersuchten kommerziellen Testkits dargestellten graphischen Darstellungen und Regressionsgleichungen. Idealerweise sollte die Steigung der Gleichung 1,0 betragen, der Schnittpunkt mit der X-Achse möglichst nahe an 0 liegen, und der Regressionskoeffizient möglichst nahe an 1,0 sein.

Abbildung 5: Lineare Regression Virion IgG-anti-PT gegenüber in-house ELISA



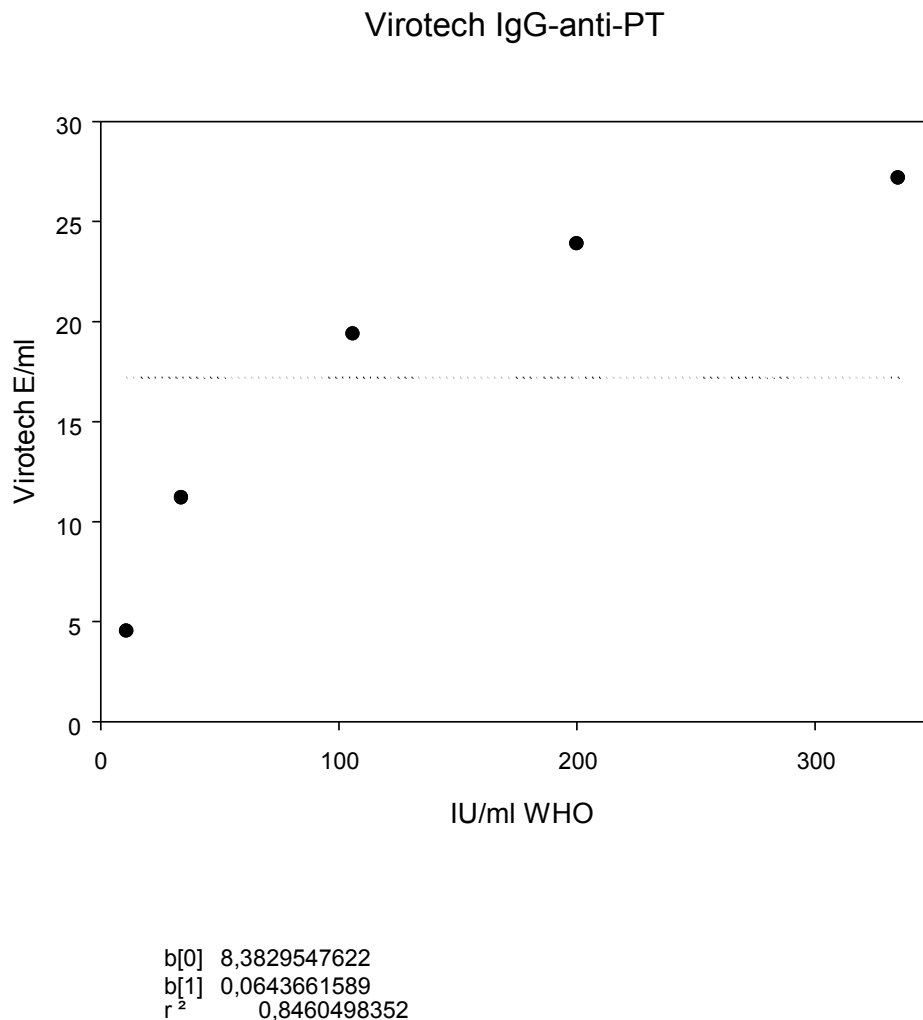
Bei einer Steigung von 0,3, einem Schnittpunkt mit der x-Achse von 33 IU/ml und einem r^2 von 0,83 war dieser Test nicht gut mit dem in-house ELISA vergleichbar.

Abbildung 6: Lineare Regression EUROIMMUN IgG-anti-PT gegenüber in-house ELISA



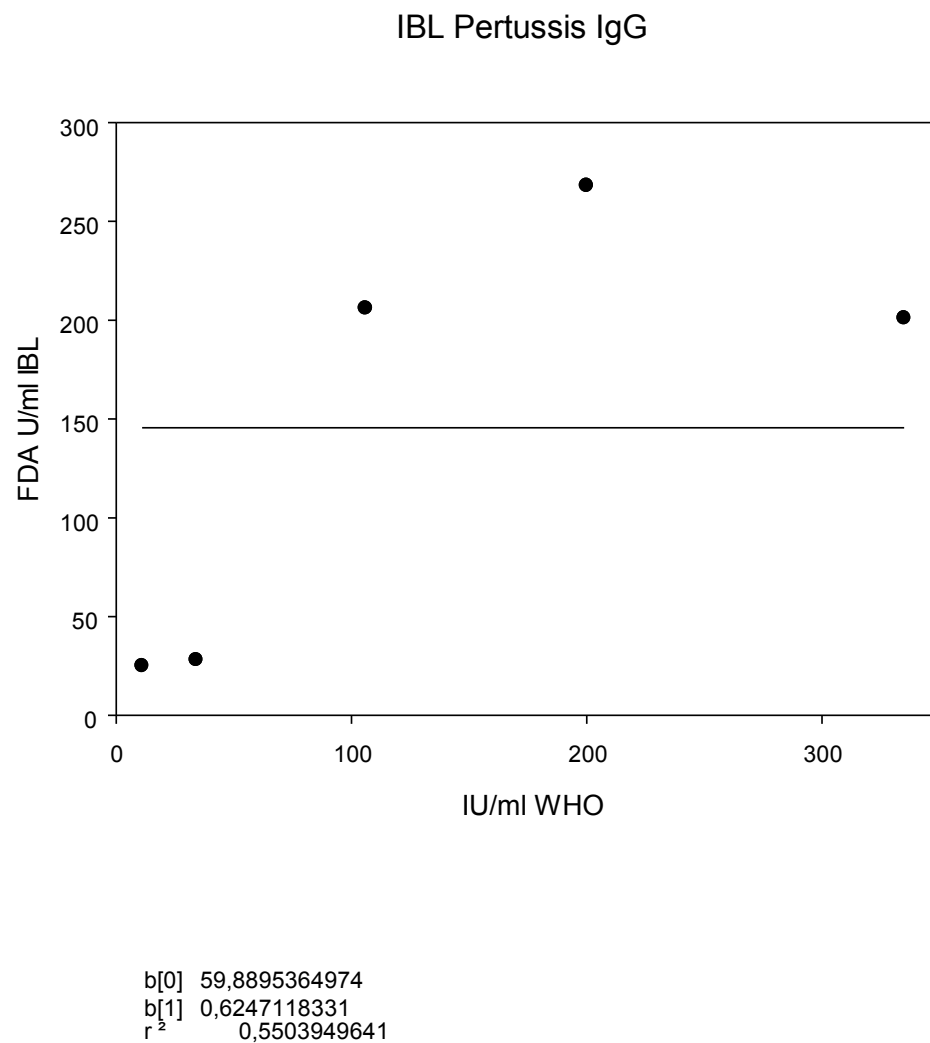
Bei diesem Test fand sich eine Steigung von 0,82, ein Schnittpunkt mit der x-Achse von 4 IU/ml sowie ein Regression von 0,97, so dass dieser Test als gut vergleichbar angesehen werden konnte.

Abbildung 7: Lineare Regression Virotech IgG-anti-PT gegenüber in-house ELISA



Aufgrund der unterschiedlichen Einheiten erschien dieser Test zunächst wenig vergleichbar. Für die arbiträren Virotech E/ml bietet der Hersteller jedoch eine komplexe Formel zur Umrechnung in IU/ml an. Nach erfolgter Umrechnung ergab sich eine akzeptable Vergleichbarkeit mit den Werten des in-house ELISA. Der Regressionskoeffizient betrug nach Umrechnung 0.98 (Formel der Regressionsgerade: $y = 0.92 x + 16.7$).

Abbildung 8: Lineare Regression IBL Pertussis IgG gegenüber in-house ELISA

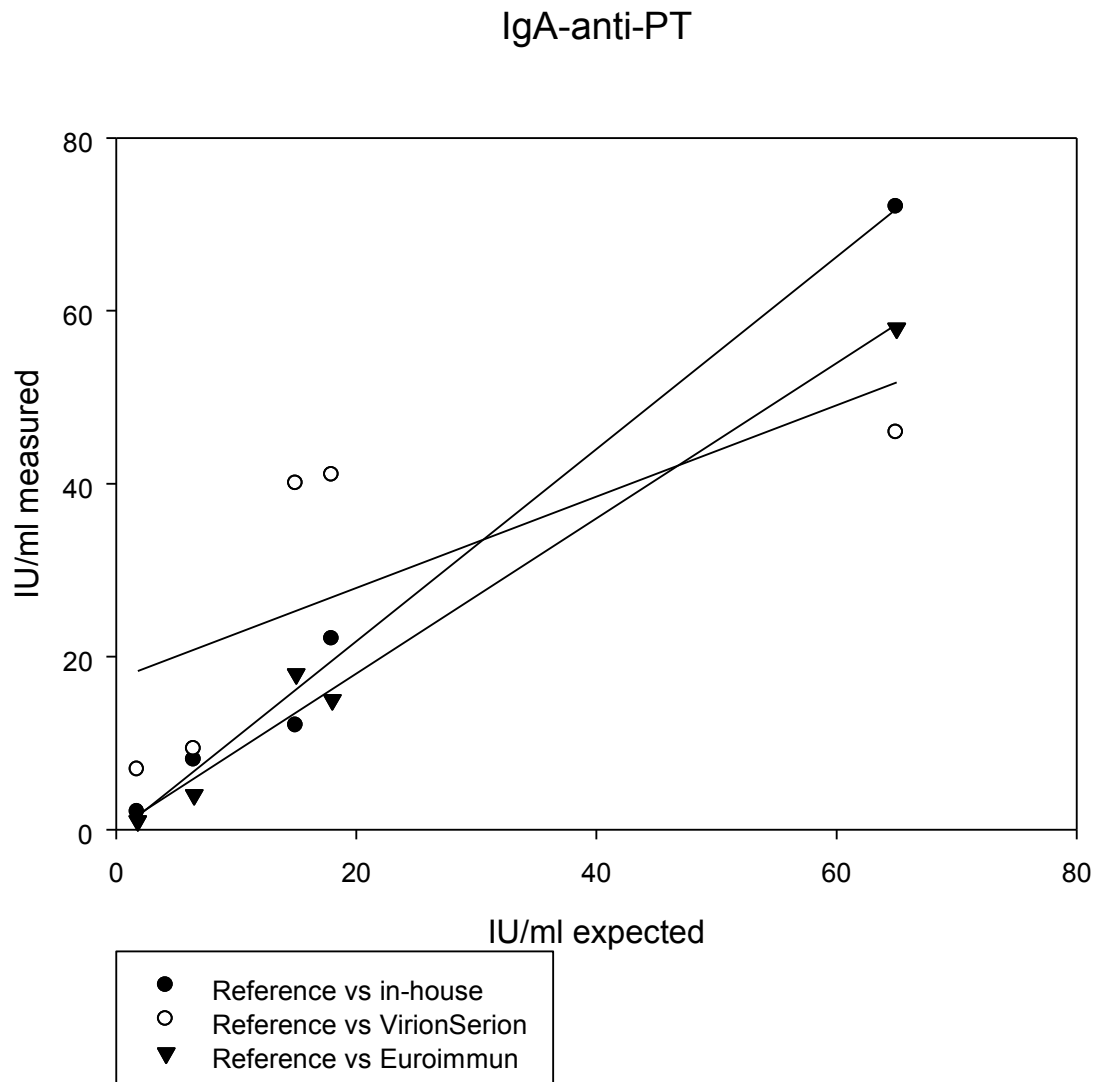


Dieser Test war mit einem r^2 von 0,55 in der Nähe der Zufallswahrscheinlichkeit und somit nicht geeignet.

Die Messwerte der anderen Testkits mit nicht gereinigten Antigenen konnten nicht direkt verglichen werden. Der VirionSerion Test gibt laut Kitanweisung vor, die Ergebnisse in IU/ml anzugeben, was laut Definition des WHO-Präparates bei Mischantigenen nicht möglich ist. Das WHO Präparat ist ausschließlich für die Bestimmung von Antikörpern gegenüber Einzelantigenen kalibriert.

Die Messung der IgA-AK gegen PT erschien noch problematischer als die der IgG-Antikörper. Abbildung 9 (Seite 26) weist aus, dass hier die Linearität der Testkits, die eine entsprechende Auswertung zulassen, also in IU/ml oder EU/ml Ergebnisse ermitteln, bereits beim Vergleich der Werte mit den erwarteten Werten der Referenzpräparationen so unbrauchbar erschien, dass auf eine Einzelauswertung verzichtet wurde.

Abbildung 9: Linearität der mit ELISA Kits gemessenen IgA-anti-PT im Vergleich mit den deklarierten Werten der Referenzpräparationen.



4.2. Verdünnungsechtheit und Positionseffekte

Weitere Untersuchungen dienten dazu, die so genannte Verdünnungsechtheit der untersuchten ELISA zu messen. Verdünnungsechtheit bedeutet, dass die gemessenen Werte eines verdünnten Referenzserums multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor die deklarierten Werte ergeben sollten. Es wurden daher unabhängig von den verwendeten Antigenen der Testkits zwei Referenzpräparationen (WHO Standard, WHO Working Reference) jeweils unverdünnt und in einer 1:10 Verdünnung analysiert. Die Ergebnisse bezüglich der Verdünnungsechtheit hinsichtlich der angegeben Einheiten zeigt

Tabelle 3, dass bei lediglich zwei Kits (Euroimmun und IBL) sich bezüglich der Einheiten eine ausreichende lineare Verdünnungsechtheit finden ließ.

Tabelle 3: Verdünnungsechtheit hinsichtlich IgG-anti-PT

	IgG unverdünnt	IgG 1:10	Verhältnis
WHO Referenz II	106	10,6	1:10
Merk Pertussis IgG	53	15	1:3,5
Virion Pertussis	115	25	1:4,6
Virion PT	120	41	1: 2,9
Virotech Pertussis	18	6,1	1:3,0
Virotech PT	19,4	4,5	1:4,3
Euroimmun PT	92	9	1:10
Trinitiy Pertussis	2,5	0,6	1:4,2
Novagnost Pertussis	29,6	5,6	1:5,3
IBL Pertussis	206	25	1:8,2
NovaLisa Pertussis	51	8,6	1:5,9
MP Biomedicals	n. d.	n. d.	n. d.

n.d. = nicht durchgeführt.

Eine weitere Untersuchung dient dazu, so genannte Positionseffekte auszuschließen. Dieses meint, dass ein Serum, welches z.B. an Position B1 (zweite Reihe) und B12 (zwölfte Reihe) einer Mikrotiterplatte gemessen wurde, das gleiche Ergebnis zeigen sollte. Demnach wurden zur Untersuchung möglicher Positionseffekte alle Referenzpräparationen auf allen Platten in den Reihen 2 und 12 gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigt Tabelle 4. Größere Positionseffekte waren bei den untersuchten Kits nicht nachweisbar, lediglich die Kits von Virion/Serion zeigten eine Tendenz zu niedrigeren Werten.

Tabelle 4: Positionseffekte der untersuchten ELISA Kits für IgG-anti-PT

Verhältnis der IgG-Antikörper im Vergleich Reihe 2 / Reihe 12	Angabe in %
Referenzpräparate (Sollwert)	100%
Dr. Merk Pertussis IgG	97 %
Virion Pertussis	86 %
Virion PT	90 %
Virotech Pertussis	100 %
Virotech PT	98 %
Euroimmun PT	94 %
Trinity Pertussis	89%
Novagnost Pertussis	96 %
IBL Pertussis	100 %
NovaLisa Pertussis	98 %
MP Biomedical	n. d.

4.3. Intra-assay Variationen

Ein Kriterium für die Robustheit eines Testsystems ist der Umfang, in dem die Ergebnisse der in einem einzelnen Ansatz gemessenen identischen Seren schwanken. Diese Varianz wird als „Intraassay“ Variation bezeichnet, im Gegensatz zu der so genannten „Interassay“ Variation mit der die Schwankungen von Tag zu Tag beschrieben werden.

Tabelle 5 zeigt die Intraassay Variation bei den einzelnen ELISA Kits, die insgesamt recht zufriedenstellend erscheinen, d.h. eine Intraassay Variation von $\leq 10\%$ aufwiesen.

Beim IBL Pertussis IgG fiel bei der WHO Referenz eine Intraassay Variation von 19% auf, bei der Untersuchung der „Working Referenz“ zeigten die Kits von Trinity Biotech Novagnost und erneut IBL mit 14% bzw. 11% eine zu hohe Variation, was für die Anwendung im diagnostischen Routinebetrieb nicht wünschenswert erscheint.

Tabelle 5: Intraassay Variationen zwischen den ELISA Systemen

Produzent	% CV WHO high	% CV NIBSC low
Dr. Merk und Kollegen Pertussis IgG	10%	2%
Virion/Serion Pertussis IgG	8%	7%
Virion/Serion PT IgG	3%	5%
Virotech Pertussis IgG	3%	2%
Virotech PT IgG	5%	1%
Trinity Biotech Pertussis EIA	4%	14%
Euroimmun Pertussis IgG	10%	6%
Novagnost Pertussis IgG	4%	11%
IBL Pertussis IgG	19%	11%
Novatec Pertussis IgG	1%	2%
MP Biomedical Pertussis IgG	2%	1%

4.4. Ergebnisse der Patientenserum

Die Patientenserum wurden aufgrund des mit dem in-house ELISA verwendeten diagnostischen Algorithmus bewertet. Dieser Algorithmus wurde weiter oben auf Seite 12 in Abbildung 3 bereits dargestellt.

Die 56 gewählten Patientenserum waren wie folgt zusammengestellt:

24 Proben stammten von Patienten mit einem Hinweis auf natürlichen kürzlichen Kontakt mit Bordetellen (PCR positiv und/oder Titeranstieg zwischen Akutserum und Konvaleszentserum).

24 Seren von Patienten aus der gleichen Studie, die keinen Anhalt für kürzlichen Kontakt mit *B.pertussis* boten (Werte im Referenzbereich, PCR negativ).

8 Seren stammten aus einer Impfstoff-Studie mit einem azellulären Impfstoff [28].

Tabelle 6 zeigt die geschätzte diagnostische Sensitivität und Spezifität der untersuchten kommerziellen ELISA in Bezug auf die Bewertung des in-house ELISA. Während fast alle Kits eine ausreichende bis gute Sensitivität zeigten, war auffallend, dass alle Kits, die PT und FHA als Misch-Antigen benutzten, im Durchschnitt eine völlig unbefriedigende Spezifität aufweisen, die zwischen 52% und 59 % schwankte.

Bei den Kits, die PT als Antigen verwenden, müssen die unterschiedlichen Referenzbereiche berücksichtigt werden. Während beim in-house ELISA ein Wert von < 40 IU/ml als negativ angesehen wurde, lag die Grenze des Referenzbereichs bei den kommerziellen Kits häufig bei etwa 10 -20 IU/ml. Aufgrund des nicht linearen Messbereichs der einzelnen Kits war eine Umrechnung auf einen analogen Wert nicht möglich.

Der Euroimmun Kit verwendet die gleichen Referenzbereiche wie der in-house Kit, daher sind hier die in Tabelle 6 zusammengefassten Werte für Sensitivität und Spezifität am besten.

Tabelle 6: Diagnostische Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse von 58 Patientenseren im Vergleich zum IgG-anti-PT in-house ELISA
(Anmerkung: alle grenzwertigen Befunde wurden als positiv bewertet)

	Sensitivität	Spezifität
Dr. Merk Pertussis IgG	100 %	51 %
Virion/Serion Pertussis IgG	86 %	56 %
Virion/Serion PT IgG	89 %	70 %
Virotech Pertussis IgG	87 %	81 %
Virotech PT IgG	84 %	87 %
Trinity Biotech Pertussis EIA	91 %	59 %
Euroimmun Pertussis IgG	91 %	90 %
Novagnost Pertussis IgG	94 %	55 %
IBL Pertussis IgG	100 %	52 %
Novatec Pertussi IgG	95 %	54 %
MP Biomedical Pertussis IgG	n. d.	n .d.

Die Schätzungen zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität der Messungen von IgA-Antikörpern sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Bei den

kommerziellen Kits benutzen laut Angabe der Hersteller sowohl der Euroimmun Kit als auch der Virotech PT Kit gereinigtes PT als Antigen, alle anderen verwenden eine Mischung aus PT und FHA.

Es ist ferner zu berücksichtigen, dass der in-house ELISA mit einem Wert von 12 IU/ml als obere Grenze des Referenzbereiches relativ sensitiv eingestellt ist. Erneut zeigt sich bei der Messung der IgA-AK das Problem der mangelnden Spezifität bei solchen Kits, die PT und FHA-Antikörper als Antigen verwenden. Inwieweit die nicht befriedigende Spezifität des Virotech PT-IgA-ELISA auf das Antigen oder das Konjugat zurückzuführen ist, kann nicht abschließend beurteilt werden.

Tabelle 7: Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse von 58 Patientenseren im Vergleich zum IgA-anti-PT in- house ELISA
(Anmerkung: alle grenzwertigen Befunde wurden als positiv bewertet)

	Sensitivität	Spezifität
Dr. Merk Pertussis IgA	53 %	74 %
Virion/Serion Pertussis IgA	68 %	67 %
Virotech Pertussis IgA	69 %	70 %
Virotech PT IgA	71 %	84 %
Euroimmun Pertussis IgA	73 %	94 %
Novagnost Pertussis IgA	72 %	75 %
IBL Pertussis IgA	64 %	68 %
Novatec Pertussis IgA	68 %	75 %
MP Biomedicals Pertussis IgA	n. d.	n. d.

Unter den Patientenproben befanden sich auch Seren von Probanden nach Impfung mit azellulärem Pertussis-Impfstoff. Da diese Impfung auch die Bildung von IgA-Antikörpern gegen FHA induzierte [28], wurden in einer Reihe mit Mischantigenen (PT und FHA) messenden ELISA auch IgA-Antikörper in diesen Serumproben nachgewiesen.

5. Diskussion

Die Untersuchung der kommerziellen Testsysteme erbrachte ein insgesamt unbefriedigendes Ergebnis. Im Vergleich zu einer vor zehn Jahren durchgeführten ähnlichen Studie [24] hat sich zwar die Qualität der Kits verbessert, nach wie vor sind viele der hier untersuchten Kits jedoch verbesserungsbedürftig. Dies betrifft zum einen den linearen Messbereich der Kits, wobei nur einer der untersuchten ELISA Linearität zwischen WHO Referenz und gemessenen Werten zeigte. Aufgrund der fehlenden Linearität ist auch die Verdünnungsechtheit der meisten ELISA unbefriedigend. Ein Positionseffekt ist hingegen meist nicht nachzuweisen.

Im Vergleich zu den Werten eines etablierten in-house ELISA, mit dessen Hilfe gemeinsam mit 21 Institutionen weltweit das WHO Serum charakterisiert wurde [25], ist die Spezifität aller solchen Kits, die mit einem Mischantigen von PT und FHA messen, sehr schlecht [24,29]. Für die Diagnostik der Erkrankung sollte idealerweise der Anstieg von Antikörpern zwischen einer „Akutprobe“ und einer „Konvaleszenzprobe“ nachgewiesen werden. Da dies aber nur in seltenen Fällen in der Praxis passiert, ist die Diagnostik auf etablierte „cut off“ Werte für Antikörper gegen Pertussis Antigen angewiesen. Solche diagnostischen „cut off“ Werte existieren aber nur für anti-PT, da sich für Antikörper gegen FHA gezeigt hat, dass keine ausreichende Spezifität dieser Antikörper existiert [20].

Da ab 2009 ein WHO-Referenzpräparat vorliegt, sind die Hersteller der Kits aufgefordert, möglichst umgehend ihre Kits auf eine lineare und verdünnungsechte Messung von Antikörpern gegen PT umzustellen. Die Bestätigung von Werten im sogenannten „Graubereich“ kann dann über eine zweite Serumprobe, aber auch gegebenenfalls über die Untersuchung einer weiteren Antikörperspezifität (z.B. anti-FHA), erfolgen.

Von den relevanten Antikörpern liegen nur für IgG-AK gegen Pertussis Toxin Daten zu möglichen Grenzwerten vor. Sehr hohe „cut-offs“ (z.B. > 200

IU/ml) haben zwar eine gute Spezifität, Ihre Sensitivität ist jedoch eingeschränkt [4]. Die Verwendung niedriger Werte hat den Nachteil geringer Spezifität, wobei Untersuchungen in den Niederlanden gezeigt haben [18], dass bei einem „cut-off“ von ~ 50 IU/ml noch eine Spezifität von 95 % erreicht wird.

Als Referenz in der folgenden Auswertung wird folgendes Vorgehen vorgeschlagen:

$IgG\text{-}PT \geq 100$ IU/ml = Anhalt für kürzlichen Kontakt.

$IgG < 40$ EU/ml = kein Anhalt für kürzlichen Kontakt.

$IgG\text{-}PT \geq 40$ EU/ml aber < 100 EU/ml = Spezifität sichern

(Untersuchung einer zweiten Probe, eines weiteren Isotypen oder weiteren Antigenspezifität) [19, 20].

Wichtig ist auch, dass eine Beurteilung der Immunität gegen Pertussis mit Hilfe von serologischen Methoden nicht möglich ist.

Diese verschiedenen cut-off Werte für IgG-anti-PT bei Jugendlichen und Erwachsenen sind nochmals in Tabelle 8 zusammengefasst:

In Massachusetts bevorzugte man eine hohe Spezifität bei Verwendung eines cut-off $\geq \sim 200$ EU/ml IgG-anti-PT (≥ 20 $\mu\text{g/ml}$) [30]. In den Niederlanden fanden Verwendung ein cut-off von ≥ 125 EU/ml IgG-anti-PT mit hoher Spezifität und ein cut-off von ≥ 62 EU/ml mit niedriger Spezifität [4,18]. In Deutschland wurde vorgeschlagen ein cut-off $\geq \sim 40$ EU/ml IgG-anti-PT zusammen mit ≥ 40 EU/ml IgA-anti-FHA [21]. Eine seroepidemiologische Untersuchung in Europa benutzte cut-off Werte von ≥ 125 EU/ml und diese Daten können als Referenzdaten benutzt werden [31]. Eine Seroepidemiologie von US-Seren modellierte drei verschiedene Populationen, übereinstimmend mit ihrem Niveau von IgG-anti-PT: ein hoher cut-off war beziffert von ≥ 94 EU/ml ein niedriger cut-off war festgelegt bei ≥ 48 EU/ml [19,20]. Diese Daten zeigen, dass das Niveau zwischen 48 EU/ml und 94 EU/ml als indeterminiert anzusehen ist und weitere Bestätigung notwendig ist.

Die Benutzung eines cut-off ≥ 50 IU/ml kann in besonderen Situationen hilfreich sein, in denen eine höhere Sensitivität erforderlich ist [32]. Eine jüngst erschienene Zusammenfassung aus Dänemark, den Niederlanden und Großbritannien verglich ROC-Kurven und zeigte, dass das Niveau zwischen 60 IU/ml und 75 IU/ml den besten Einzel-cut-off ergibt [33]. Folglich unabhängig von Unterschieden in den Populationen und deren Impfstrategien, einzelnen cut-offs, am Beispiel der Pertussis-Serologie, sind vergleichbar in allen Ländern, in denen sie evaluiert wurden [31].

Tabelle 8: Vorgeschlagene "cut-off" Werte von IgG-anti-PT bei Jugendlichen und Erwachsenen

Land	Studienart	Cut-off	Sens.	Spec.	Quelle
MA, USA	Kohortenstudie	~200 IU/ml	67%	99.9%	30
NL	Kohortenstudie	125 IU/ml	70%	99%	32
		62 IU/ml	80%	95%	
D	Kohortenstudie	50 IU/ml	80%	95%	21
EU	Seroepidemiologie	125 IU/ml	n.a.	n.a.	31
USA	Seroepidemiologie	94 IU/ml	n.a.	n.a.	19
		46 IU/ml	n.a.	n.a.	
AUS	Klin. Validierung	50 IU/ml	besser als 100 IU/ml		32

n.a. = nicht anwendbar

Alle anderen Antikörperspezifitäten haben keine entsprechenden „cut-offs“ so dass zum Beispiel für IgA-anti-PT aufgrund seiner hohen Spezifität die untere Grenze der Quantifizierbarkeit, in unserem Testsystem also 12 IU/ml, als cut-off angenommen wurde.

Einige Besonderheiten der kommerziellen ELISA Kits, die während dieser Studie auffielen, erscheinen bemerkenswert:

Einige ELISA quantifizierten die „low“ Referenz (106 IU/ml) deutlich höher als die „high“ Referenz (335 IU/ml)

Zwei ELISA bestimmten den IgA-Gehalt der Referenz #5 FDA/CBER dessen deklarierte Konzentration mit 140 IU/ml IgA-anti-PT und 280 IU/ml IgA-anti-FHA extrem hoch ist, als grenzwertig,

Der Dr.Merk ELIMMUN Test analysierte alle Proben als hoch positiv mit Ausnahme der negativen Kontrolle.

Der Trinity Biotech Test wurde ohne jegliche Testanleitung geliefert.

Zwischenzeitlich wurde von den EU Referenzlaboratorien eine Empfehlung verfasst, die die hier präsentierten Ergebnisse berücksichtigt [23], nach der sich sukzessiv die Hersteller der Testkits zu richten scheinen. Eine kürzlich durchgeführte Analyse eines in Deutschland durchgeführten Ringversuchs ergab allerdings, dass in 2010 noch immer etwa zwei Drittel der Laboratorien Testsysteme verwenden, die nicht den Regeln der EU Referenzlaboratorien entsprechen [26].

Ungeachtet dieser Bemühungen und auch Erfolge um Standardisierung sind bei der serologischen Diagnostik der Pertussis auch weiterhin eine Reihe von Problemen und Einschränkungen zu beachten:

- Eine Beurteilung der Immunität aufgrund von Antikörperbestimmungen ist nicht möglich
- Eine Diagnostik von Infektionen mit *B.parapertussis* mittels anti-PT ist nicht gegeben.
- Die gebildeten Antikörper nach Infektion und nach Impfung sind nicht unterscheidbar. Hieraus ergibt sich, dass die Serologie für ca. 1 Jahr nach Impfung nicht eindeutig zu interpretieren ist [23].
- Eine Bestimmung von IgM Antikörpern (Ak vorwiegend gegen LOS) ist nicht sinnvoll.
- Eine Messung des Impferfolges durch Antikörperbestimmungen ist nur in Sonderfällen wie Immundefekten sinnvoll.

6. Zusammenfassung

Studiendesign: Es wurde eine Leistungsüberprüfung von kommerziell erhältlichen ELISA Systemen zum Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen Antigene von *B.pertussis* durchgeführt.

Methodik: Anhand eines Panels von Patientenproben und Referenzpräparationen wurde die Vergleichbarkeit der gemessenen Werte in Bezug auf ein standardisiertes ELISA Verfahren (in-house Kit) ermittelt. Es wurden 20 ELISA Systeme verglichen. Die Kits verwendeten sowohl Einzelantigene (Pertussis-Toxin) wie auch Mischantigene (Pertussis-Toxin und Filamenthämagglutinin). Alle Kits, außer der in-house Methodik, analysierten Patientenserum in einer einzigen Verdünnung.

Ergebnisse: Von den untersuchten ELISA Kits war nur einer in der Lage, die Ergebnisse linear in IU/ml anzugeben. Die meisten anderen Kits zeigten eine Lin/Log Beziehung zu den Referenzpräparationen. Kits mit gereinigtem PT zeigten eine gute bis befriedigende Korrelation mit einem in-house ELISA, Kits mit Mischantigenen zeigten bei ausreichender Sensitivität insgesamt eine unbefriedigende bis ungenügende Spezifität.

Schlussfolgerung: Im Gegensatz zu den mit dem in-house Kit gemessenen Werten korrelierten die mit den kommerziellen Kits gemessenen Antikörperkonzentrationen gegen Pertussis-Antigene meist nicht linear zu den IU/ml eines WHO Referenzpräparates. Kits mit Mischantigenen (PT und FHA) zeigen in der diagnostischen Bewertung eine unbefriedigende Spezifität. Für die Diagnostik der Pertussis sollten somit ausschließlich Kits verwendet werden, die gereinigtes PT als Antigen verwenden und die Antikörper in Bezug auf das WHO Referenzpräparat in IU/ml quantifizieren, so dass eine diagnostische Beurteilung nach den Empfehlungen der EU Referenzlaboratorien möglich ist.

7. Literaturverzeichnis

1. Locht C: *Bordetella* molecular microbiology. Taylor & Francis. London, 2007;
2. Pittman M: Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. Rev.Infect. Dis. 1979; 3: 401-411
3. Mooi FR et al.: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. Emerg. Infect. Dis. 2009; 15: 1206-1213
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: 326-382
5. Mooi FR & Greef SC: The case of maternal vaccination against pertussis. Lancet Infect. Dis. 2007; 7: 214-215
6. Hewlett EL, Donato GM, Gray MC: Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making AMP. Molec. Microbiol. 2006; 59: 447-459
7. Arciniega JL et al.: Human serologic response to envelope-associated proteins and adenylate cyclase toxin to *Bordetella pertussis*. J.Infect.Dis. 1991; 163: 135-142
8. Cherry JD et al.: Determination of serum antibody to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in vaccinated and unvaccinated children and in children and adults with pertussis. Clin.Infect.Dis. 2004; 38: 502-507
9. Flak TA, Goldman WE: Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. Cell. Microbiol. 1999; 1: 51-60
10. Baraff LJ et al.: Analysis of adverse reactions to diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine by vaccine lot, endotoxin content, pertussis vaccine potency and percentage of mouse weight gain. Ped. Infect. Dis.J. 1989; 8: 502-507

11. Wendelboe AM, Njamkepo E, Bourillon A et al.: Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Ped. Infect.Dis. J.* 2007; 26: 293-299
12. Gustafsson L, Hessel L, Storsaeter J et al.: Long term Follow up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5 and 12 month of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age. *Pediatrics* 2006; 118: 978-984
13. Long SS, Welkon CJ, Clark JL et al.: Widespread silent transmission of pertussis in families: antibodies correlates of infection and symptomatology. *J. Infect. Dis.* 1990; 161: 480-486
14. Mertsola J, Ruuskanen O, Eerola E et al.: Intrafamilial spread of pertussis. *Ped. Infect. Dis. J.* 1983; 103: 359-363
15. Kretzschmar M, PF Teunis and RG Pebody. Incidence and reproduction numbers of pertussis: estimates from serological and social contact data in five European countries. *PLoS Med.* 2010; 7(6) e1000291;
16. Ward J et al.: *Bordetella pertussis* infections in vaccinated and unvaccinated adolescents and adults, as assessed in a national prospective randomized acellular pertussis vaccine trial. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: 151-157
17. Kapasi A, B.D. Meade, B. Plikaytis, L. et al. Comparative study of different sources of pertussis toxin (PT) as coating antigens in IgG-anti-PT enzyme linked immunosorbent assays. *Clin.Vaccine.Immunol.* 2012; 19:64-72
18. Versteegh FG, Mertens PL, de Melker HE, Roord JJ, Schellekens JF, Teunis PF: Age-specific long-term course of IgG-antibodies to pertussis toxin after symptomatic infection with *Bordetella pertussis*. *Epidemiol.Infect.* 2005; 133: 737-748
19. Baughmann, AL, Bisgard KM, Edwards KM, Guris D, Decker MD, Holland K, Meade BD, Lynn F: 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; 11: 1045-1053

20. Baughman AL, Bisgrad KM, Cortese MM, Thompson WW, Sanden GN, Strebel PM: Utility of Composite Reference Standards and Latent Class Analysis in Evaluation the Clinical Accuracy of Diagnostic test for Pertussis. *Clin.Vacc.Immunol.* 2008; 15: 106-114
21. Wirsing von König CH, Gounis S, Laukamp S, Bogaerts H, Schmitt HJ: Evaluation of a single-sample serological technique for diagnosing pertussis in unvaccinated children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 18: 341-345
22. Reder S, Riffelmann M, Becker C, Wirsing von Koenig CH: Measuring IgG-antibodies to tetanus toxin, diphtheria toxin and pertussis toxin with single antigen ELISAs and with a bead based multiplex assay. *Clin.Vacc.Immunol.* 2008; 15: 744-749
23. Guiso N, G. Berbers, N.K. Fry, Q. He, M. Riffelmann, C,H, Wirsing von König, and the EU Pertstrain Group. What to do and what not to do in pertussis serology: Recommendations from the European reference laboratories. *Eur.J.Clin.Microbio.Infect.Dis.* 2011; 30:307-12
24. Koesters K, Riffelmann M, Dohrn B, Wirsing von Koenig CH: Comparison of six commercially available tests for detecting antibodies to Bordetella antigens. *Clin.Lab.Diagn.Immunol.* 2000; 7: 422-426
25. Xing, D, Wirsing von Koenig CH, Newland P, Riffelmann M, Meade B, Corbel M, Gaines-Das R: Characterization of Reference Material for Human Antiserum to Pertussis Antigens Proposed by an International Collaborative Study. *Clin.Vacc.Immunol.*, 2009; 16:303-11
26. Riffelmann, M., K.P. Hunfeld, I.Müller, D.Xing, N.Kennerknecht, and C.H.Wirsing von König. External quality assessment of pertussis serology in Germany. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 2013; 32:421-3
27. Kennerknecht, N., Riffelmann, M., Schmetz, J., Wirsing von König, C.H. Comparison of commercially available immunoblot assays measuring IgG and IgA antibodies to Bordetella pertussis antigens. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 2011; 30:1531-35
28. Knuf M, Zepp F, Meyr C, Grzegowski E, Wolter J, Riffelmann M, Wirsing von König CH: Immunogenicity of single dose of reduced-

antigen acellular pertussis vaccine in a non-vaccinated adolescent population. *Vaccine* 2006; 24: 2043-48

29. He Q, Mertsola J, Himanen JP, Ruuskanen O, Viljanen MK: Evaluation of pooled and individual components of *Bordetella pertussis* as antigens in an enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12: 690-695
30. Yih WK, Lett SM, des Vignes FN, Garrison KM, Sipe PL, Marchant CD: The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J. Infect. Dis.* 2000; 182: 1409-1416
31. Pebody RG, Gay NJ, Giammanco A, Baron S, Schellekens J, Tischer A, Olander RM, Andrews NJ, Edmunds WJ, Lecoer H, Levy-Bruhl H, Maple PA, de Melker H, Nardone A, Rota MC, Salmaso S, van Conyn Spaendonck MA, Swidsinski S, Miller E: The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* in Western Europe. *Epidemiol. Infect.* 2005; 133: 159-171
32. de Melker, H.E., F.G. Versteegh, M.A. Conyn-Van Spaendonck, L.H. Elvers, G.A. Berbers, A. van der Zee, and J.F. Schellekens. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies to pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 800-806
33. Mertens, P.L., F.S. Stals, E.W. Steyerberg, and J.H. Richardus. Sensitivity and specificity of single IgA and IgG antibody concentrations for early diagnosis of pertussis in adults: an evaluation for outbreak management in public health practice. *BMC Infect. Dis.* 2007; 753

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase-Hämolysin
CBER	Center for Biologics Evaluation & Research
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FDA	Food und Drug Administration
FHA	filamentäres Hämagglutinin
HLT	Hitzelabiles Toxin
INSTAND	Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V.
LOS	Lipooligosaccharid
n. d.	nicht durchgeführt
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
PRN	Pertaktin
PT	Pertussis Toxin
ROC	Receiver Operator Characteristics (Kurven zur Schätzung der Sensitivität und Spezifität)
RT	Raumtemperatur
TCT	Tracheacytotoxin
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von *B.pertussis* sowie der wichtigsten Virulenzfaktoren

Abbildung 2: Prinzip des ELISA zum Nachweis von Antikörper gegen Pertussis Toxin (PT)

Abbildung 3: Diagnostischer Algorithmus des Referenz-in-house ELISA

Abbildung 4: Lineare Regression der IgG-anti-PT in IU/ml von kommerziellen ELISA gegen einen in-house Referenz-ELISA

Abbildung 5: Lineare Regression Virion IgG-anti-PT gegenüber in-house ELISA

Abbildung 6: Lineare Regression EUROIMMUN IgG-anti-PT gegenüber in-house ELISA

Abbildung 7: Lineare Regression Virotech IgG-anti-PT gegenüber in-house ELISA

Abbildung 8: Lineare Regression IBL Pertussis IgG gegenüber in-house ELISA

Abbildung 9: Linearität der mit ELISA Kits gemessenen IgA-anti-PT im Vergleich mit den deklarierten Werten der Referenzpräparationen.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Deklarierte Antikörperkonzentration in den WHO/NIBSC Referenzpräparationen und den CBER/FDA Referenzseren

Tabelle 2: Testdaten der in dieser Studie untersuchten Assays

Tabelle 3: Verdünnungsechtheit hinsichtlich IgG-anti-PT

Tabelle 4: Positionseffekte der untersuchten ELISA Kits für IgG-anti-PT

Tabelle 5: Intraassay Variationen zwischen den ELISA Systemen

Tabelle 6: Diagnostische Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse von 58 Patientenseren im Vergleich zum IgG-anti-PT in-house ELISA

Tabelle 7: Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse von 58 Patientenseren im Vergleich zum IgA-anti-PT in-house ELISA

Tabelle 8: Vorgeschlagene "cut-off" Werte von IgG-anti-PT bei Jugendlichen und Erwachsenen

Anhang:

Standardarbeitsanleitung (SA) des in-house ELISA

Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte:

Immunoplate I Mikrotiterplatten (Maxisorb, Nunc, Wiesbaden)

Microplate Washer (Molecular Devices, MWG Biotech, Ebersberg), VI_GE_103

Microplate Washer (Tecan), VI_GE_126

Inkubator (Commander, ABBOTT), VI_GE_106

Microplate Reader (Molecular Devices, MWG Biotech, Ebersberg) mit PC mit Auswertungssoftware (Molecular Devices, PC 486SX), VI_GE_104

Reagenzien:

Primärreagenzien

Antigene werden aufgrund eines „Material Transfer Agreement“ von Fa. GlaxoSmithKline Biologicals SA; Rue de l'Institut 89, B-2200 Rixensart zur Verfügung gestellt.

Pertussis Toxin (nativ), aliquotiert, gefroren;

Filamenthämagglutinin (nativ), aliquotiert, gefroren;

Rinderserumalbumin (BSA) (SIGMA)

TWEEN 20

Glycerin (SIGMA)

Antikörper (Ziege) gegen humanes IgG, affinitätschromatographisch gereinigt, mit alkalischer Phosphatase markiert (Kirkegaard und Perry, Bestell Nr. 075-1002, Medac, Wedel)

Antikörper (Ziege) gegen humanes IgA, affinitätschromatographisch gereinigt, mit alkalischer Phosphatase markiert (Kirkegaard und Perry Bestell Nr. 075-1001; Medac, Wedel)

Alkalische Phosphatase DGKC (DaiSys, Diagnostic Systems GmbH, Holzheim)

Gebrauchsreagenzien:

Carbonatpuffer 50 mM, pH 9,6

1,59 g Na_2CO_3

2,9 g NaHCO_3

in 1,0 l Aqua dest.

Phosphatgepuffertes NaCl (PBS), 0,85%, pH 7,2 (gebrauchsfertig):

von der Apotheke werden 100 ml eines 5-fachen Konzentrats geliefert, dieses enthält:

4,25 g NaCl

1,12 g KH_2PO_4

4,47 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

100 ml des Konzentrats werden mit 400 ml Aqua dest. verdünnt.

Rinderserumalbumin (BSA)-Stocklösung 5 %-ig:

2,5 g

in 50 ml (PBS) gebrauchsfertiger phosphatgepuffertem NaCl lösen

Inkubations- und Verdünnungspuffer [PBS mit 0,2 % BSA (w/v) und 0,05 % TWEEN 20 (v/v)]:

480 ml (PBS) gebrauchsfertige phosphatgepufferte NaCl

20 ml Rinderserumalbumin (BSA)-Stocklösung 5 %-ig

250 µl Tween 20

Waschpuffer [PBS mit 0,05 % TWEEN 20 (v/v)]:

500 ml (PBS) gebrauchsfertige phosphatgepufferte NaCl

250 µl Tween 20

1 M NaOH (Apotheke)

Konjugatlösung: Inhalt eines Fläschchens des lyophilisierten Konjugats wird in 1ml Glycerinlösung (1 ml Glycerin plus 1ml Wasser) gelöst.

gebrauchsfertige Konjugatverdünnung in Inkubationspuffer:

1:10.000 für alle IgG-Antikörperbestimmungen (z.B. 1 µl in 10 ml Puffer)

1:1.000 für die Bestimmung von PT-IgA und Pertaktin-IgA (z.B. 1 µl in 1 ml Puffer)

1:5.000 für die Bestimmung von FHA-IgA (z.B. 1 µl in 5 ml Puffer)

Standards-und Kontrollproben

Standard:

Als Standard wird das WHO-Referenzserum High Titer (Sample A und Sample D) eingesetzt.

Das lyophilisierte WHO-Referenzserum wird jeweils in 1 ml Aqua bidest. gelöst, in 100 µl Aliquots unverdünnt eingefroren und vor Gebrauch entsprechend 1:50 zur Bestimmung von IgG und 1:20 zur Bestimmung von IgA verdünnt.

Folgende Konzentrationen wurden für diesen WHO-Standard deklariert [22]:

PT-IgG	335 EU/ml
PT-IgA	65 EU/ml
FHA-IgG	130 EU/ml
FHA-IgA	65 EU/ml

Kontrollserum:

Als Standard wird das WHO-Referenzserum Low Titer (Sample B und Sample C) eingesetzt.

Das lyophilisierte WHO-Referenzserum wird jeweils in 1 ml Aqua bidest. gelöst, in 100 µl Aliquots unverdünnt eingefroren.

Folgende Konzentrationen wurden für diesen NIBSC-Standard deklariert [22]

PT-IgG:	106 EU/ml (Bereich: 94-118)
PT-IgA	20 EU/ml (Bereich: 13-31)
FHA-IgG	122 EU/ml (Bereich: 111-131)
FHA-IgA	85 EU/ml (Bereich: 71-106)

Testdurchführung

Coating der Platten

PT in Carbonatpuffer auf 0,5 µg/ml verdünnt

FHA wird in PBS auf 1 µg/ml verdünnen.



100 µl PT und FHA -Verdünnung in jede Vertiefung in je einer Mikrotiterplatte geben



über Nacht (16 Stunden) bei +4 °C inkubieren



3-mal mit Waschpuffer waschen



90 min bei 37 °C trocknen



in eine Folie einschweißen



bei 4 °C lagern

maximale Lagerzeit: PT-Platten 1 Monat, FHA-Platten: 3 Monate

Coating der Platten mit Coating- und Blocking Buffer (biomol GmbH)

Antigen Coating Buffer herstellen: 1 Volumenanteil 5x Konzentrat mit 4 Volumenanteilen A.dest, 15 min schütteln

Blocking Buffer gebrauchsfertig

PT in **Antigen Coating Buffer** auf 0,5 µg/ml verdünnt, 15 min schütteln

FHA in **Antigen Coating Buffer** auf 1 µg/ml verdünnt, 15 min schütteln



100 µl PT und FHA -Verdünnung in jede Vertiefung in je einer Mikrotiterplatte geben



über Nacht (16 Stunden) bei RT inkubieren, Platten mit Folie abkleben



3-mal mit Waschpuffer waschen



300 µl Blocking-Buffer in jede Vertiefung geben



über Nacht (16 Stunden) bei RT im Dunkeln inkubieren, Platten mit Folie abkleben



Blocking-Buffer entfernen



Die Platten können ab jetzt in den Test eingesetzt werden oder getrocknet gelagert werden



90 min bei 37 °C trocknen



in eine Folie einschweißen



bei 4 °C lagern

Platten- und Probenvorbereitung

Die Platten vor Testansatz auf Raumtemperatur bringen.

Die Platten werden vor Gebrauch 3-mal mit Waschpuffer gewaschen.

Herstellung der Proben-Primärverdünnungen in Röhrchen mit Inkubationspuffer aus:

Standard = WHO-Referenzserum High Titer (Sample A und Sample D)

Patientenseren

positiv Kontrolle = WHO-Referenzserum Low Titer (Sample B und Sample C)

Zur Bestimmung der IgG-AK wird zu 20 µl Probe 1000 µl Inkubationspuffer hinzugefügt.

Zur Bestimmung der IgA-AK wird zu 50 µl Probe 1000 µl Inkubationspuffer hinzugefügt.

Weitere Verdünnungen werden in der Mikrotiterplatte hergestellt:

für Patientenseren und der positiv Kontrolle:

In die erste Vertiefung (A / E) 200 µl Primärverdünnung geben, in weiteren drei Vertiefungen (B-D / F-H) werden je 100 µl Puffer vorgelegt.

Durch Überpipettieren von jeweils 100 µl werden die weiteren Verdünnungen hergestellt.

100 µl aus der letzten Verdünnung werden verworfen.

Standard:

In die erste Vertiefung (A) 200 µl Primärverdünnung geben, in die weiteren sieben Vertiefungen (B-H) werden je 100 µl Puffer vorgelegt.

Durch Überpipettieren von jeweils 100 µl werden die weiteren Verdünnungen hergestellt.

100 µl aus der letzten Verdünnung werden verworfen.

Testdurchführung

Die Platten werden nach folgendem Schema mit je 100 µl Material beschickt.

Reihe 1 Vertiefung A, B: bleiben leer (Blank)

Reihe 1 Vertiefung C, D: Puffer, mit Antiserum (Ak-Kontrolle)

	<u>IgG-Bestimmung</u>	<u>IgA-Bestimmung</u>
Reihe 1 Vertiefung E positiv Kontrolle	1:50	1:20
Reihe 1 Vertiefung F positiv Kontrolle	1:100	1:40
Reihe 1 Vertiefung G positiv Kontrolle	1:200	1:80
Reihe 1 Vertiefung H positiv Kontrolle	1:400	1:160

	<u>IgG-Bestimmung</u>	<u>IgA-Bestimmung</u>
Reihe 2 Vertiefung A: Standard	1:50	1:20
Reihe 2 Vertiefung B: Standard	1:100	1:40
Reihe 2 Vertiefung C: Standard	1:200	1:80
Reihe 2 Vertiefung D: Standard	1:400	1:160
Reihe 2 Vertiefung E: Standard	1:800	1:320
Reihe 2 Vertiefung F: Standard	1:1600	1:640
Reihe 2 Vertiefung G: Standard	1:3200	1:1280

Reihe 2 Vertiefung H: Standard

1:6400

1:2560

Serum Nr	IgG-Bestimmung	IgA-Bestimmung
Reihe 3 Vertiefung A: #1	1:50	1:20
Reihe 3 Vertiefung B: #1	1:100	1:40
Reihe 3 Vertiefung C: #1	1:200	1:80
Reihe 3 Vertiefung D: #1	1:400	1:160
Reihe 3 Vertiefung E: #2	1:50	1:20
Reihe 3 Vertiefung F: #2	1:100	1:40
Reihe 3 Vertiefung G: #2	1:200	1:80
Reihe 3 Vertiefung H: #2	1:400	1:160

Reihe 4 - 12 wie Reihe 3

↓

Die Platten werden mit Folie verschlossen und für 60 min bei 37 °C inkubiert.

↓

Die Platten werden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen

↓

In jede Vertiefung der Platten mit Ausnahme von A1 und B1 wird 100 µl verdünntes enzymmarkiertes Antiserum gegen menschliches IgG (Anti-IgG) bzw. Anti-IgA gegeben.

↓

Die Platten werden mit Folie verschlossen und für 60 min bei 37°C inkubiert.

↓

Die Platten werden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen.

↓

In alle Vertiefungen der Platte werden 100 µl frisch hergestelltes AP-Reagenz (p-Nitrophenylphosphat) gegeben.

↓

Die Platte wird 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

↓

Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl 1M NaOH gestoppt.

↓

Die Platte wird im Mikropplatten-Reader bei 405-650 nm photometriert und mit dem entsprechenden Programm nach einer 4-Parameter Logik ausgewertet.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Geldern, Oktober 2016

Karsten Thiel