

BARTONELLA HENSELAE & QUINTANA IFA IgM

Für die *In vitro* diagnostik

PBAHQM: Kit für die indirekte Antikörper-Immunfluoreszenz (IFA) zur Bestimmung von *Bartonella henselae* & *Bartonella quintana* IgM-Antikörpern in humanem Serum/Plasma.

EINLEITUNG:

Es gibt mehrere Formen der menschlichen Bartonellose. Die typische Form der Krankheit durch Katzenkratzer kann allgemeine Ursache von Lymphadenopathien bei Kindern und Jugendlichen sein. Atypische Formen treten in weniger als 25% der Fälle auf und können mit Konjunktivitis, Fieber unbekannten Ursprungs, neurologischen Komplikationen oder hepatosplenischem Angriff einhergehen. Bei immunsupprimierten Kranken wurden häufiger bakterielle Angiomatosis, Endokarditis oder Knochenmarksinfektion beschrieben.

Diagnoseform der Krankheit ist gewöhnlich die Serologie. Im Allgemeinen werden Immunfluoreszenztechniken eingesetzt. Nach Beginn der Adenopathien treten gegenüber *Bartonella henselae* hohe Titer auf, die sich nach mehreren Monaten verringern.

Bartonella quintana ist einer der Hauptverursacher für das Dazische Fieber, eine relativ schwere Erkrankung, die durch Läuse übertragen wird und gekennzeichnet ist durch rekurrentes Fieber mit drei oder vier fiebrigen Episoden von jeweils vier oder fünf Tagen Dauer. Die ersten Symptome treten nach einer Inkubationszeit von 15 bis 25 Tagen auf und beinhalten hohes Fieber, starke Kopfschmerzen, Schmerzen beim Bewegen des Augapfels, Muskelschmerz in Beinen und Rücken und häufig auch prätibiale Schmerzen. Es sind auch schwache und asymptomatische Formen wie die Endokarditis beschrieben worden. *B. quintana* ist einer der Verursacher der bazillären Angiomatose bei immununterdrückten Personen. Diese Krankheit wird gewöhnlich über die Serologie diagnostiziert. Im Allgemeinen werden Immunofluoreszenztechniken angewendet. In Fällen von Endokarditis werden normalerweise hohe Antikörper-Titer festgestellt.

PRINZIP DES TESTS:

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz basiert auf der Reaktion der Antikörper der Probe mit dem an die Oberfläche des Objektträgers gebundenen Antigen. In der Probe vorhandene spezifische Antikörper reagieren mit dem Antigen, nicht-bindende Immunglobuline werden im Waschprozess beseitigt. Im nächsten Schritt reagiert der Antigen-Antikörper-Komplex mit Fluorescein- markiertem Antihumanglobulin und wird durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

EIGENSCHAFTEN DES KITS:

Alle Reagenzien mit Ausnahme von PBS werden gebrauchsfertig geliefert. Die Kit-Bestandteile sind zur leichteren eindeutigen Identifizierung mit einer Nummer versehen. Im Versuchsverfahren werden die Nummern der in jedem Abschnitt zu verwendenden Reagenzien angegeben.

BESTANDTEILE DES KITS:

- 1 VIRCELL BARTONELLA HENSELAE & QUINTANA SLIDE: 10 Objektträger zu 10 Muldenpaaren mit Bartonella. Jedes Muldenpaar enthält eine Mulde mit *B. henselae*, Stamm Houston-1 (ATCC 49882), und die andere Mulde mit *B. quintana*, (CIP-Nr. 107027), die in Vero-Zellen gezüchtet, mit Formaldehyd inaktiviert und mit Aceton fixiert wurden.
- 2 VIRCELL PBS: 1 Ampulle zur Zubereitung von 1 l PBS pH 7,2.
- 3 VIRCELL B. HENSELAE & QUINTANA IgM POSITIVE CONTROL: 200 µl positives Testserum für IgM (enthält Natriumazid).
- 4 VIRCELL B. HENSELAE & QUINTANA NEGATIVE CONTROL: 200 µl negatives Testserum (enthält Natriumazid).
- 5M VIRCELL ANTI-HUMAN IgM FITC CONJUGATE: 2 Ampullen mit 1,1 ml Fluorescein-markiertem Anti-Human-IgM-Konjugat in Phosphatpuffer mit Eiweißstabilisator, Evans-Blau und Natriumazid.
- 6 VIRCELL MOUNTING MEDIUM: 3 ml Eindeckmedium: gepuffertes Glycerol (enthält Natriumazid).
- 7 VIRCELL ANTI HUMAN IgG GLOBULIN (SORBENT): 2 Ampullen 1,5 ml Sorbent (Antihuman-IgG-Ziegenserum, enthält Natriumazid).

Bei 2-8°C lagern, Verfallsdatum überprüfen

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:

- Geeignete Präzisionspipetten.
- Inkubator/temperierbares Bad.
- Destilliertes Wasser.
- 24x60 mm großes Objektdeckglas.
- Fluoreszenzmikroskop und nach Herstellerempfehlungen geeignete Filter
- Feuchte Kammer

LAGERBEDINGUNGEN:

Das Kit ist bei der angegebenen Temperatur bis zum Verfallsdatum stabil. Verwenden Sie die Komponenten des Kits nicht mehr nach Ablauf des Verfalldatums. Das angegebene Verfalldatum gilt immer dann, wenn die Komponenten geschlossen bei der angegebenen Temperatur gelagert werden.

LAGERUNG DER ANGEBROCHENEN REAGENZIEN:

Reagenz	Stabilität
Rekonstituierte PBS	4 Monate bei 2-8°C, stets innerhalb des Verfalldatums
VIRCELL SLIDE	Nach dem Öffnen am gleichen Tag verwenden
Übrige Bestandteile	Datumsangabe auf Verpackung bei 2-8°C

STABILITÄT UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN:

Alle Reagenzien zur Vermeidung mikrobiischer Verunreinigungen unter aseptischen Bedingungen verwenden. Nur zur Testdurchführung erforderliche Menge an Sorbent, Kontrollen, PBS und Konjugat benutzen. Restliche Lösung niemals in die Ampullen zurückgeben. Die PBS muss nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C gelagert und darf bei Trübung nicht verwendet werden.



VIRCELL, S.L. ist nicht verantwortlich für Fehler, die durch eine falsche Handhabung der Reagenzien dieses Kits verursacht wurden.

EMPFEHLUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN:

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur PBS, Objektträger, Sorbent und Eindeckmedium sind zu gleichwertigen Substanzen anderer Artikelnummern und Chargen von IFA VIRCELL kompatibel. Die übrigen Bestandteile sind unter verschiedenen Kits kompatibel, wenn deren Chargennummer übereinstimmt.
3. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.
4. Keine beschädigten Kits verwenden.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Sorbent, Konjugat und Kontrollen dieses Kits enthalten Material tierischen Ursprungs. Die Kontrollen enthalten zudem Substanzen humanen Ursprungs. Obwohl die Humanserum-Kontrollen dieses Kits auf Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg), Hepatitis C Antikörper und Human Immunodeficiency Virus Antikörper getestet und für negativ befunden wurden, sollten Kontrollseren und Patientenproben als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Vertiefungen der Titerplatte sind mit inaktiviertem Antigen von *B. henselae* & *B. quintana* beschichtet. Trotzdem sollten auch sie als potentiell infektiös angesehen und mit der nötigen Vorsicht behandelt werden. Gegenwärtig kann keine Methode eine vollständige Abwesenheit von infektiösen Bestandteilen versichern. Alle Materialien sollten wie potentiell infektiöse Stoffe entsorgt werden. Beachten Sie die örtlichen Bestimmungen für die Entsorgung von klinischem Material.
7. Aufgrund des Natriumazidgehalts (Konzentration <0,1%) ist der Kontakt von Konjugat, Sorbent, Eindeckmedium und Kontrollen mit Säuren und Schwermetallen zu vermeiden.
8. Aufgrund des Glycerolgehalts ist der Kontakt des Eindeckmediums mit Säuren zu vermeiden. Keinen hohen Temperaturen aussetzen.
9. Evans-Blau (Konzentration <0,1%) ist krebserregend. Haut- und Augenkontakt vermeiden. Betroffene Fläche bei Kontakt mit Wasser abwaschen und einen Arzt rufen.
10. Nur die in diesem Prospekt beschriebenen Protokolle benutzen. Entsprechen die in diesem Test eingesetzten Inkubationsintervalle oder -temperaturen nicht den Angaben, können die Ergebnisse fehlerhaft sein.
11. Die Kreuzverunreinigung durch Serum verschiedener Patienten auf einem Objektträger kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zur Vorbeugung erforderliche Vorkehrungen treffen.
12. Die Optik des Mikroskops, die Wartung und die Art der Lichtquelle können die Fluoreszenzqualität beeinträchtigen.
13. Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich Raumtemperatur aussetzen.
14. Jeder Objektträger ist nur einmal zu benutzen. Er darf weder geteilt, noch dürfen unbenutzte Felder wiederverwendet werden.
15. Das Kit enthält Glaselemente, die bei Bruch zu Körperverletzungen führen können. Vorsichtig damit umgehen.
16. Prüfen, dass die Sorbentzugabe zur Probe zu einer mit bloßem Auge festzustellenden Immunpräzipitation führt.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG:

Das Blut muss unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktionstechniken von erfahrenem Personal entnommen werden. Zur Vermeidung von Probenverunreinigungen wird der Einsatz aseptischer oder steriler Techniken empfohlen. Die Sera sind bei 2-8°C gekühlt zu lagern, wenn sie innerhalb der sieben auf die Entnahme folgenden Tage verarbeitet werden. Verzögert sich die Verarbeitung, sind sie bei -20°C einzufrieren, wobei unnötiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte, da dies zu einer Verringerung des Immunglobulintiters und insbesondere von IgM führen könnte. Keine hyperlipämischen oder verunreinigten Sera verwenden. Partikel aufweisende Sera können durch Zentrifugieren geklärt werden.

TESTVORBEREITUNG:

Das einzige vor der Testdurchführung vorzubereitende Reagenz ist die PBS. Hierfür den Inhalt von Ampulle 2 auf 1 Liter destilliertes Wasser zugeben und bis zur vollständigen Auflösung schütteln. Nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C aufbewahren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Reagenzien und Objektträger vor deren Öffnung auf Raumtemperatur bringen.
2. 1/2 verdünnung der Sera vornehmen, hierfür 25 µl Serum in 25 µl PBS 2 geben. Die Testsera 3 und 4 dürfen nicht verdünnt werden.
3. Verdünnte Sera mit Anti-Human-IgG-Sorbent 7 behandeln; hierfür 5 µl der Sera auf 25 µl Sorbent geben und kräftig schütteln. Die Testsera 3 und 4 dürfen weder verdünnt noch mit Sorbent behandelt werden. Behandelte Sera mit können einfach so benutzen oder können abschleudern, um die Serumpräzipitation zu klären, die den Test nicht beeinflusst.
4. 5 µl Verdünnung in jede Mulde jedes Muldenpaars des Objektträgers 1 geben. Den gleichen Vorgang mit der Positivkontrolle 3 und der Negativkontrolle 4 ausführen.
5. 90 Minuten lang bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
6. Objektträger kurz mit PBS spülen (vermeiden, PBS direkt auf die Felder zu schütten). Objektträger 10 Minuten lang in PBS tauchen. Leicht mit destilliertem Wasser spülen.
7. Objektträger 1 abtrocknen lassen.
8. Auf jedes Feld 5 µl Anti-Human-IgM-Lösung 5M zugeben. (Erfordert keine Verdünnung).
9. 30 Minuten lang bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
10. Schritte 6 und 7 wiederholen.
11. Auf jedes Feld einen kleinen Tropfen Eindeckmedium 6 zugeben und Deckglas aufsetzen.
12. So schnell wie möglich bei 400x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Andernfalls bis zur Betrachtung höchstens 24 Stunden lang bei 2-8°C dunkel lagern.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE:

Jede Charge wird einer internen Qualitätskontrolle unterzogen, bevor einer Freigabe unter Spezifikationen zugestimmt wird, die strenger als die für den Anwender sind. Die endgültigen Ergebnisse der Qualitätskontrolle jedes einzelnen Artikels sind erhältlich.

Dem Kontrollmaterial liegen als Referenz nachweislich intern geprüfte Serumplatten zugrunde.



TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER:

Der Serumtiter ergibt sich aus der höchsten Verdünnung, bei der eine positive Reaktion festzustellen ist.

Positive Kontrolle: Fluoreszenz mit bazillärer Morphologie, apfelgrün.

Negative Kontrolle: Fehlende Fluoreszenz

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Die Reaktion ist positiv, wenn fluoreszenz mit bazillärer Morphologie, apfelgrün festgestellt wird.

Die Reaktion ist negativ, wenn fehlende Fluoreszenz festgestellt wird.

Von den in der Beilage definierten Fluoreszenzmustern abweichende Ergebnisse dürfen nicht als positiv interpretiert werden.

Das Verhalten von IgG- und IgM-Antikörpern bei Primär- und Reinfektionen ist unterschiedlich. Bei einer Primärinfektion treten IgG und IgM in fast allen Fällen auf (IgM erscheint vor IgG). Bei einer Reinfektion treten in allen Fällen keine IgM-Antikörper auf und die IgG-Erkennung ist die einzige Möglichkeit der Diagnose. Bei vielen Krankheiten können im ganzen Leben des Patienten hohe IgG-Titer bestehen, während sich IgM im Allgemeinen nur zwei oder drei Monate nach der Krankheit im Serum hält. Sie sind daher ein wirkungsvoller Marker für eine kürzliche Infektion.

EINSCHRÄNKUNGEN:

1. Der Kit ist für die Untersuchung von humanem Serum/Plasma.
2. Der Benutzer dieses Kits sollte die Packungsbeilage sorgfältig lesen und verstehen. Zur Erzielung zuverlässiger Ergebnisse muss streng das Protokoll befolgt werden. Dies bezieht sich insbesondere auf die richtige Pipettierung von Proben und Reagenzien, Waschen und Inkubationszeiten.
3. Die Probenergebnisse sind in Verbindung mit klinischer Beurteilung und sonstigen Diagnoseverfahren zu bewerten.
4. Dieser Test zeigt nicht den Infektionsort. Er kann eine Erregerisolierung nicht ersetzen.
5. Wenn kein signifikantes Ansteigen des Antikörper-Niveaus vorhanden ist, bedeutet dies nicht, dass eine Infektion ausgeschlossen werden kann.
6. Sehr früh im Verlauf einer Infektion genommene Proben können eventuell keine erkennbaren IgG-Anteile enthalten. In diesen Fällen wird die Durchführung eines Versuchs zur IgM-Bestimmung oder eine zweite Probennahme nach Ablauf von 14 bis 21 Tagen empfohlen, die dann zur Bestimmung einer Serokonversion parallel zur Originalprobe zu testen ist.
7. Bei der Erkennung von IgG bei Neugeborenen erzielte Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, da Mutter-IgG vor der Geburt passiv von der Mutter auf den Fetus übertragen wird. Bei Kindern unter sechs Monaten ist die IgM-Bestimmung der bessere Infektionsindikator.
8. Für die Diagnose einer Infektion sollten niemals nur die Ergebnisse der Antikörperbestimmung einer einzigen Probe herangezogen werden. Eine paarweise Testung der Proben (akut und latent) sollte erfolgen, um eine Serokonversion oder einen signifikanten Titeranstieg nachzuweisen.
9. Es ist bei bis zu 95 % der Proben über Kreuzreaktionen zwischen *B. quintana* und *B. henselae* berichtet worden.
10. Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen

Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

11.

LEISTUNGSDATEN:**• SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT:**

Gegenüber von der indirekten Antikörper-Immunfluoreszenz einer anderen Handelsfirma wurden 67-Serum/-Plasma-Proben mit BARTONELLA HENSELAE & QUINTANA IFA IgM getestet und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

	Probe NR	Sensitivität	Spezifität
<i>B. henselae</i> IgM	67	100%	98,29%
<i>B. quintana</i> IgM	67	100%	98,29%

Die Sera, die keine spezifische Reaktion aufwiesen, wurden aus den Endberechnungen ausgeschlossen.

• INTRA-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurde 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und unter gleichen Arbeitsbedingungen einzeln in Fünfergruppen in einem einzigen von der gleichen Person durchgeführten Versuch pipettiert.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• INTER-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurden 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und einzeln unter 5 verschiedenen Bedingungen pipettiert, bei denen sich die Person oder der Durchführungstag änderten.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• KREUZREAKTIVITÄT UND INTERFERENZEN:

Gegenüber anderen Bakterien der Syndromgruppe (*Coxiella burnetii*), anderen phylogenetisch nahestehenden Bakterien (*Brucella*), andere durch Arthropoden übertragene Bakterien (*Rickettsia conorii*) und antinuklearen Antikörpern wurden 10 als positiv bekannte Proben ausgetestet.

Die getesteten Proben ergaben negative Ergebnisse und bewiesen dabei die spezifische Reaktion des Versuchs ohne von den beschriebenen Stoffen verursachte Kreuzreaktion oder Interferenzen.

Zwischen *B. henselae* und *B. quintana* finden Kreuzreaktionen statt, daher können Proben vorliegen, die auf beide Spezies positiv sind, wenngleich bei verschiedenen Titern. Eine Probe wird als positiv betrachtet, wenn sie mindestens zwei Titer oberhalb der anderen liegt.

• ANDERE INTERFERENZVERSUCHE:

Zur Bestimmung von IgM- und IgG-Antikörpern gegenüber zwei bakteriellen und zwei viralen Antigenen wurde an 25 Sera mit Rheumafaktor ein IFA-Test durchgeführt. Außerdem wurde an zwei weiteren für jedes einzelne Antigen charakterisierten Sera ein IFA-Versuch zur Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern durchgeführt. Zur IgM-Bestimmung wurden die Sera mit Anti-IgG-Sorbent behandelt. Es bestätigte sich die Wirksamkeit der Sorbentbehandlung zur Vermeidung von durch den Rheumafaktor verursachten IgM-Interferenzen.

Die Wirksamkeit des empfohlenen Sorbent zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse durch IgG-Überschuss wurde nachgewiesen.



BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLS:

	Für die <i>In vitro</i> Diagnostik
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Bei x-y°C lagern
	Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
	Chargen-Nummer
	Bestell-Nummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	<X> Vertiefungen

LITERATUR:

1. Arvand, M., A. J. Klose, D. Schwartz-Porsche, H. Hahn, and C. Wendt. 2001. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 39:743-6.
2. Chamberlin, J., L. Laughlin, S. Gordon, S. Romero, N. Solorzano, and R. L. Regnery. 2000. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect fluorescence antibody assay: test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity. *J Clin Microbiol* 38:4269-71.
3. Chomel, B. B. and J. M. Rolain. 2007. *Bartonella*. p. 850-861. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington DC.

4. Fenollar, F. and D. Raoult. 1999. Diagnosis of rickettsial diseases using samples dried on blotting paper. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:483-8.

5. Fournier, P. E., J. L. Mainardi, and D. Raoult. 2002. Value of microimmunofluorescence for diagnosis and follow-up of *Bartonella endocarditis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 795-801.

6. Jacomo, V., P. J. Kelly, and D. Raoult. 2002. Natural History of *Bartonella* Infections (an Exception to Koch's Postulate). *Clin Diagn Lab Immunol* 9:8-18.

7. Koehler, J. E., M. A. Sanchez, S. Tye, C. S. Garrido-Rowland, F. M. Chen, T. Maurer, J. L. Cooper, J. G. Olson, A. L. Reingold, W. K. Hadley, R. R. Regnery, and J. W. Tappero. 2003. Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever. *Clin Infect Dis* 37:559-66.

8. La Scola, B. and D. Raoult. 1996. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol* 34:2270-4.

9. Maurin, M. and D. Raoult. 1996. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin Microbiol Rev* 9:273-92.

10. McGill, S. L., R. L. Regnery, and K. L. Karem. 1998. Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* 66:5915-20.

11. Sander, A., M. Posselt, K. Oberle, and W. Bredt. 1998. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:486-90.

12. Tsukahara, M., H. Tsuneoka, H. Iino, I. Murano, H. Takahashi, and M. Uchida. 2000. *Bartonella henselae* infection as a cause of fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* 38:1990-1.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

customerservice@vircell.com

ÜBERPRÜFT: 2017/04

