

RIDA® GENE Bordetella

REF PG2505



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA[®]GENE Bordetella ist eine real-time multiplex PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* und *Bordetella holmesii* aus humanen Nasopharyngeal-Abstrichen und -Spülungen. Die RIDA[®]GENE Bordetella real-time multiplex PCR soll die Diagnose eines durch *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* bzw. *Bordetella holmesii* verursachten Keuchhustens unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Bordetella pertussis ist ein gramnegatives Bakterium, das eine akute respiratorische Infektion verursacht, die als Pertussis oder Keuchhusten bezeichnet wird. *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis* und *Bordetella bronchiseptica* verursachen seltener eine Keuchhusten-ähnliche Erkrankung mit milderem Verlauf. Pertussis kann bei Menschen jeder Altersgruppe schwere Symptome hervorrufen, die besonders bei Säuglingen lebensbedrohend sein können. Die WHO (World Health Organization) schätzt, dass 2008 weltweit ca. 16 Millionen Pertussis-Fälle auftraten, von denen ca. 195.000 Fälle bei Kindern zum Tode führten.¹ 2012 wurden in den USA 41.800 Pertussis-Fälle gemeldet.² Es wird geschätzt, dass etwa 3-35 % der *Bordetella*-Infektionen durch *B. parapertussis* verursacht werden.^{3,4} In einer US-Studie über einen Zeitraum von 3 Jahren (2008 bis 2010) wurde *B. parapertussis* in 14 % der Proben als Ursache einer Pertussis-Erkrankung nachgewiesen.⁵ *B. holmesii* konnte in einer französischen Studie in ca. 20 % der Pertussis-Erkrankungen bei Jugendlichen und Erwachsenen nachgewiesen werden.⁶ Die Übertragung einer *Bordetella*-Infektion erfolgt aerogen über eine Tröpfcheninfektion. Nach einer Inkubationszeit von 7 bis 10 Tagen verläuft die Erkrankung in 3 Stadien: Stadium catarrhale (Dauer 1–2 Wochen) mit grippeähnlichen Symptomen, Stadium convulsivum (Dauer 1–6 Wochen) mit anfallsartigem Auftreten von Hustenattacken gefolgt von Erbrechen und Stadium decrementi (Dauer 6–10 Wochen), bei dem die Hustenanfälle abklingen.^{7,8}

Bei Bevölkerungsgruppen mit einer hohen Impftrate von Säuglingen und Kindern tritt die Übertragung von Pertussis weiterhin auf, da der Impfschutz nur 5-10 Jahre anhält und eine natürliche Infektion nur für 10 bis 15 Jahre Schutz vor einer Reinfektion bietet. Daher erfolgt die Übertragung der Erkrankung in Populationen mit einer hohen Durchimpfung zwischen Jugendlichen und Erwachsenen oder zwischen Menschen, die keinen Impfschutz mehr haben.^{8,9} Eine kürzlich durchgeführte Studie deutet darauf hin, dass eine Pertussis-Impfung nicht gegen *B. holmesii* schützt.¹⁰

Für die Labordiagnostik der Pertussis-Erkrankungen stehen verschiedene Methoden, wie real-time PCR, Kultur und Serologie zur Verfügung. Die Kultur ist fast 100 % spezifisch und kann in den ersten 2 Wochen nach Symptombeginn der Erkrankung eine Sensitivität von bis zu 50 % haben, die mit der Zeit weiter abnimmt. Die kulturelle Isolierung erfordert spezielle Kulturmedien und benötigt mindestens eine Woche. Die Serologie-Diagnostik ist in der Frühphase der Erkrankung ungeeignet.

Antikörper können frühestens 2 Wochen nach der Infektion oder Impfung nachgewiesen werden. Verwendet werden können ELISA-Teste mit Pertussistoxin (PT) oder filamentösem Hämagglutinin (FHA) als Testantigen. FHA wird von allen Bordetellen gebildet, während PT nur von *B. pertussis* gebildet wird. Alle Pertussis-Impfstoffe enthalten PT, während FHA eine Komponente von azellulären Pertussis-Impfstoffen ist. Mit serologischen Tests kann eine Impfantwort nicht von einer Infektion unterschieden werden. Die real-time PCR ermöglicht einen schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweis bis zu 4 Wochen nach Symptombeginn der Erkrankung. Zudem lassen sich in einer real-time PCR die humanpathogenen *Bordetella* Spezies differenzieren.^{8,9}

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE Bordetella ist eine real-time multiplex PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* und *Bordetella holmesii*. Nach der DNA-Isolierung wird (falls vorhanden) das für *Bordetella pertussis* (IS481), *Bordetella parapertussis* (pIS1001) und *Bordetella holmesii* (IS481, hIS1001) spezifische Genfragment amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE Bordetella Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA® GENE Bordetella real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Real-time PCR-Gerät:	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- Sterile, medienfreie Nylon beflockte Abstrichtupfer (z.B. Copan Diagnostic Inc., Katalognummer 552C)
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480 II und LightCycler® 480z
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-freies Wasser)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Test die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus Nasopharyngeal-Abstrichproben

Für die DNA-Präparation aus Nasopharyngeal-Abstrichproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen für die Nasopharyngeal-Abstriche **400 µl PCR-Wasser** in ein Präparationsröhrchen vorzulegen. Den Abstrichtupfer in das Wasser tauchen und den Stab abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen, kurz vortexen und die DNA Isolierung laut Herstellerangabe des DNA-Isolierungskits oder DNA-Extraktionssystems durchführen.

Der RIDA[®]GENE Bordetella Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer-Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

8.2 DNA-Präparation aus Nasopharyngeal-Spülungen

Für die DNA-Isolierung aus humanen Nasopharyngeal-Spülungen das entsprechende Volumen für die DNA Isolierung nach Angaben des Herstellers in das DNA-Isolierungskit oder DNA-Isolierungssystem einsetzen.

Für die DNA-Präparation aus Nasopharyngeal-Spülungen wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA[®]GENE Bordetella Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer-Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR Profil

Tab. 5: DNA real-time PCR Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: DNA real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.3.2 Universal real-time PCR Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
	<i>B. holmesii</i>	533/610	
	<i>B. parapertussis</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	540/580	
	<i>B. holmesii</i>	540/610	
	<i>B. parapertussis</i>	610/670	
ABI 7500	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	<i>B. holmesii</i>	Orange	
	<i>B. parapertussis</i>	Red	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die Positive Control für *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. holmesii* liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

*¹ Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

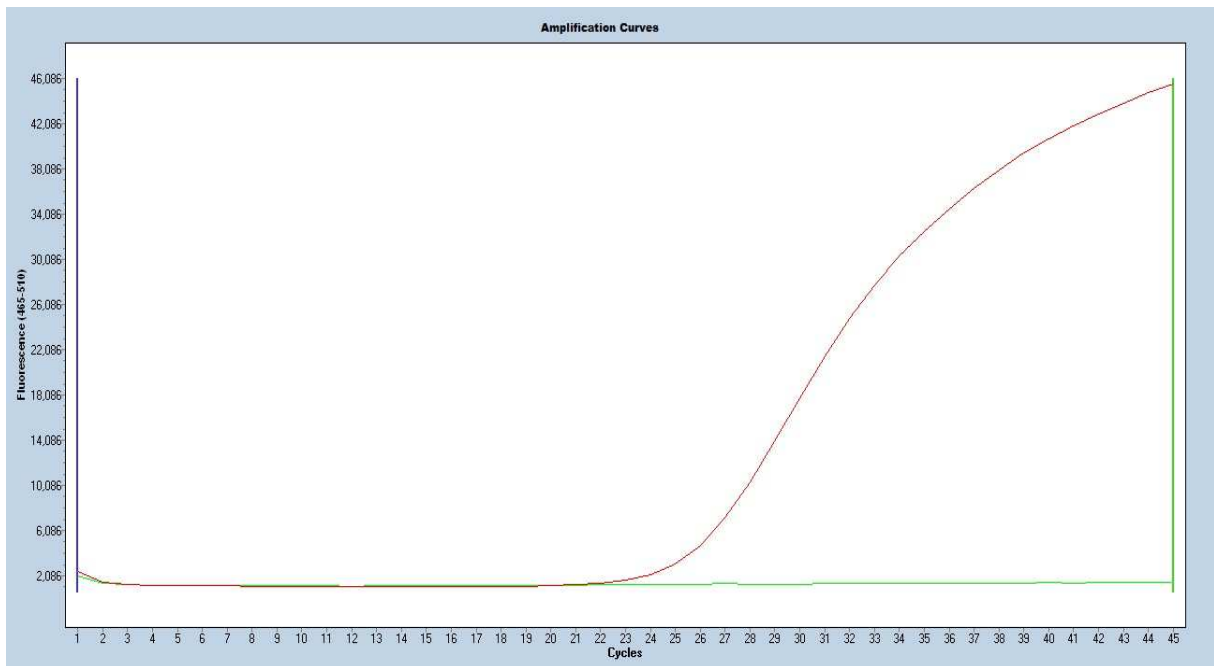


Abb.1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Bordetella pertussis/B. holmesii*) auf dem LightCycler® 480II

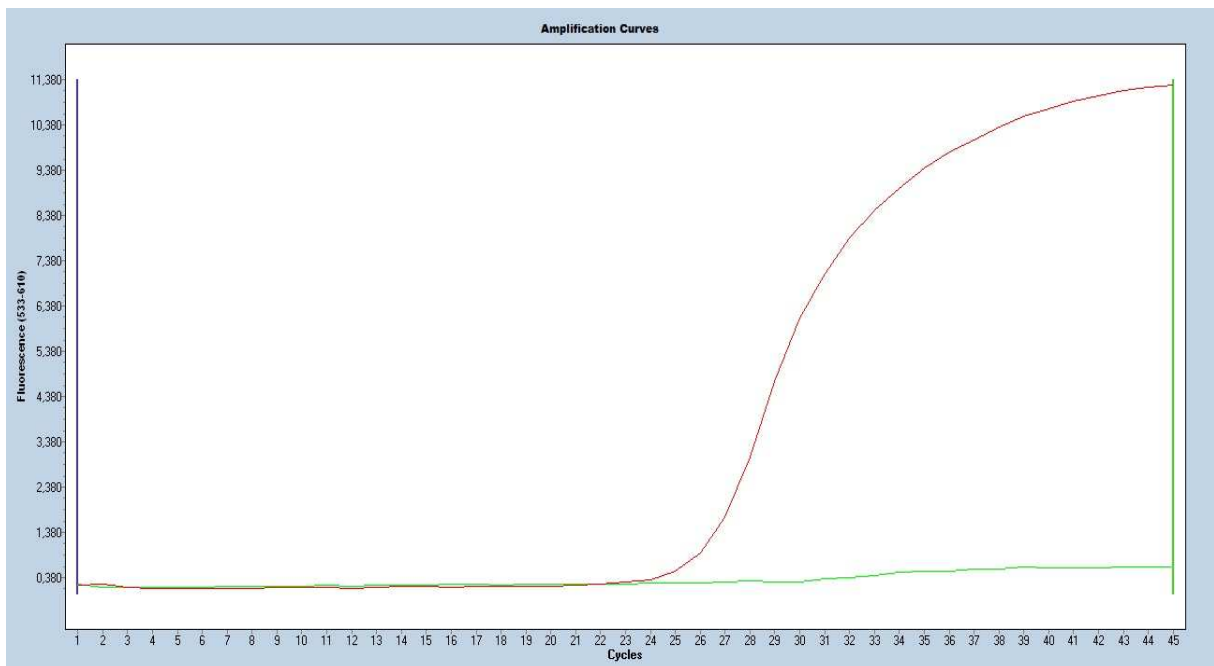


Abb.2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Bordetella holmesii*) auf dem LightCycler® 480II

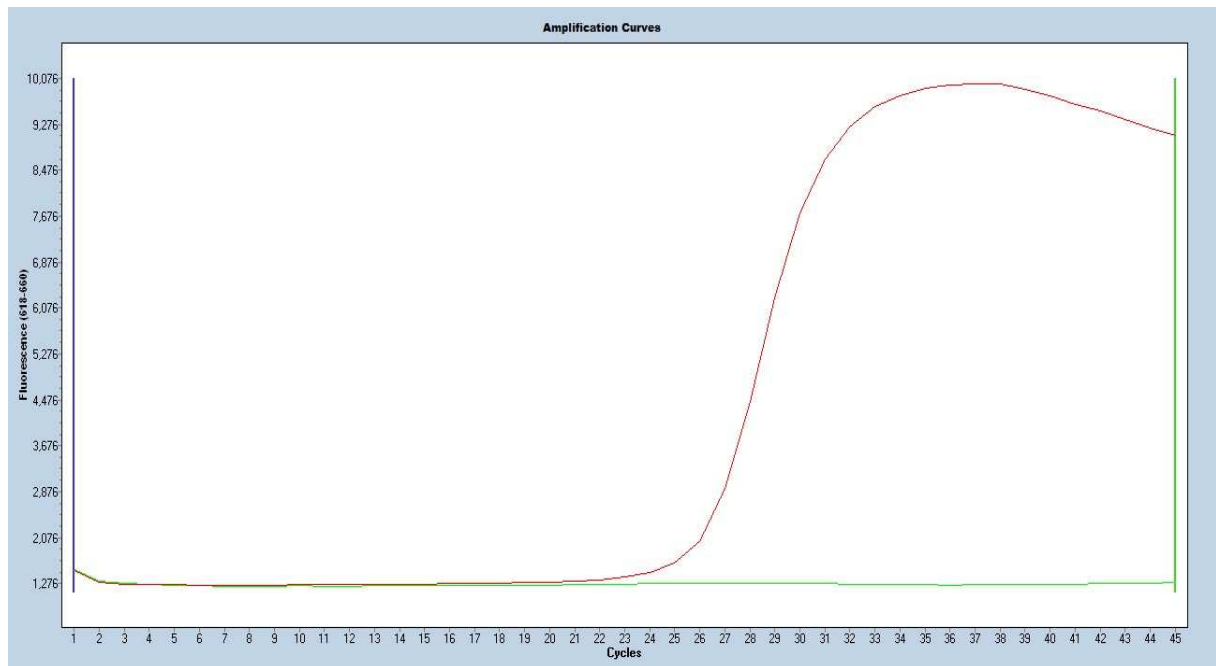


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Bordetella parapertussis*) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Probenauswertung

Zielgene			ICD	Ergebnis
<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. parapertussis</i>		
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>B. pertussis</i> nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>B. holmesii</i> nachweisbar*
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>B. parapertussis</i> nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Ungültig
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	Ungültig
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>B. pertussis</i> und <i>B. parapertussis</i> nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>B. holmesii</i> und <i>B. parapertussis</i> nachweisbar*
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene sind nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Hinweis: *siehe auch Punkt 8 in Kapitel 12: Grenzen der Methode

B. pertussis, *B. parapertussis* bzw. *B. holmesii* ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

B. pertussis, *B. parapertussis* bzw. *B. holmesii* ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle führen können.

B. pertussis, *B. parapertussis* bzw. *B. holmesii* ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Nasopharyngeal-Abstriche und -Spülungen validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®] GENE Bordetella zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die *B. pertussis*, *B. parapertussis* bzw. *B. holmesii* Zielgene (IS481, IS1001) vorhanden sind.
8. Bei einem positiven Signal für *B. pertussis* und *B. holmesii* kann aufgrund der zu detektierenden Zielgene eine Mischinfektion nicht ausgeschlossen werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE Bordetella real-time multiplex PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien / Reaktion für *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. holmesii* (s. Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6).

Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Verdünnungsreihen von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. holmesii* (jeweils 10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

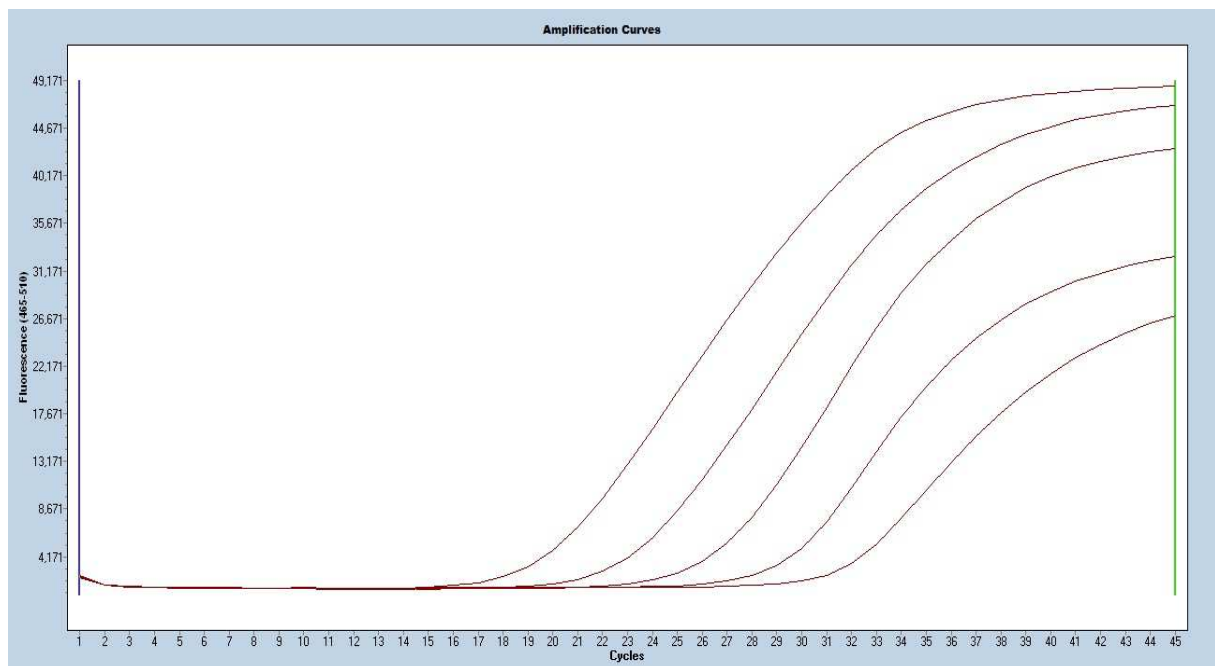


Abb. 4: Verdünnungsreihe *Bordetella pertussis*/*B. holmesii* (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

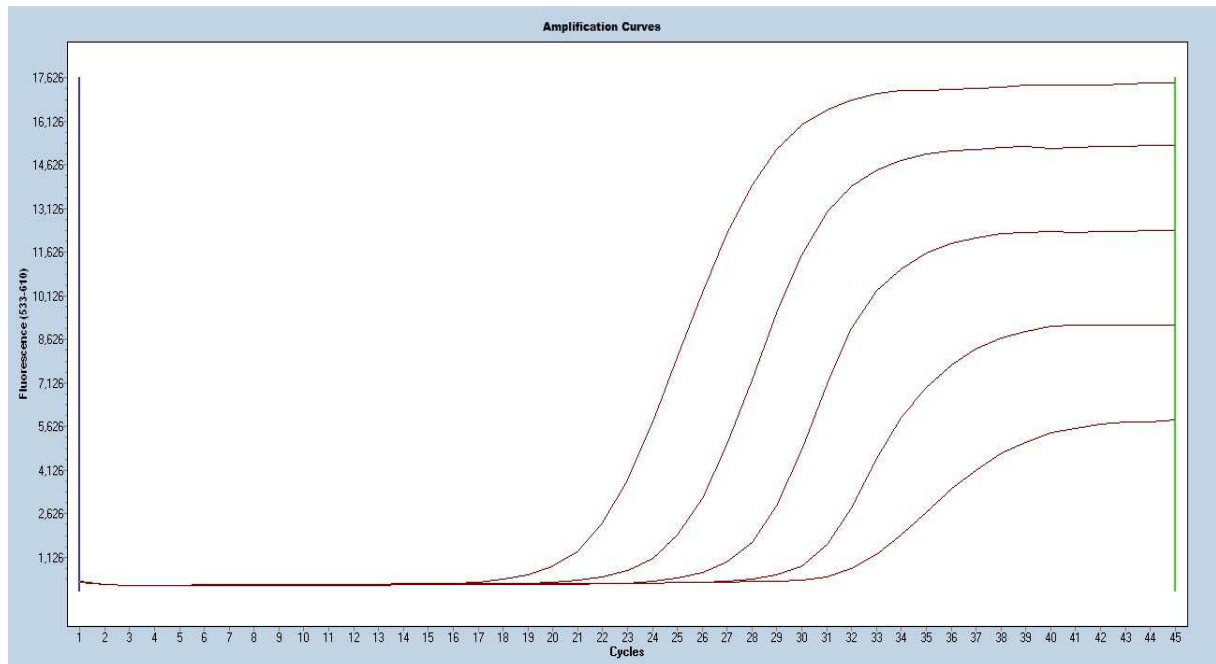


Abb. 5: Verdünnungsreihe *Bordetella holmesii* (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

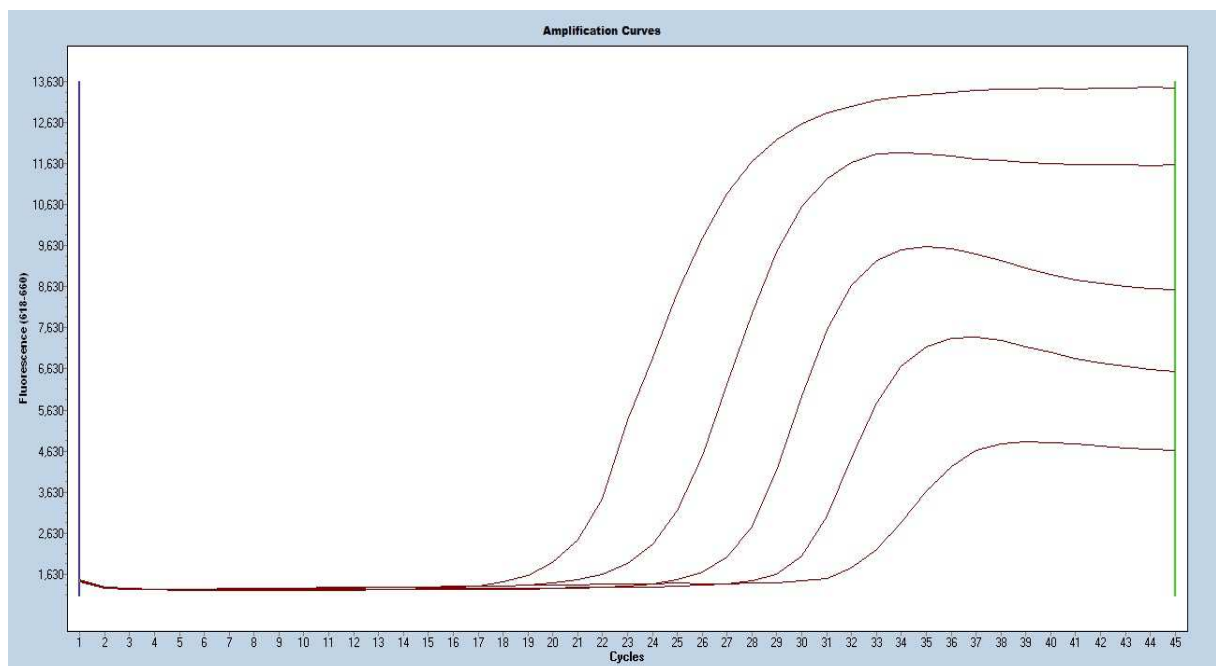


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Bordetella parapertussis* (10^5 - 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, DNA-Extraktion und dem DNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Bordetella real-time multiplex PCR ist spezifisch für *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. holmesii* aus humanen Nasopharyngeal-Abstrichen und -Spülungen. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung










<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Coxsackie virus B4, human	-	Parainfluenza virus, serotype 3	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Cytomegalovirus, human	-	Parainfluenza virus 4b strain CH19503, human	-
Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Rhinovirus, human, Genogruppe A	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	Influenza virus A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus SM131</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Strain FH of Eaton Agent	-	Streptococcus pneumoniae strain NCTC 7465	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Metapneumovirus, human</i>	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Neisseria meningitides, strain FAM18</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	Parainfluenza virus 1 strain C35, human	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Coronavirus 229E, human	-	Parainfluenza virus 2 strain Greer, human	-		

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-05-17	3. Testprinzip 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9.4 Detektionskanaleinstellung 11. Interpretation der Ergebnisse 13.2 Analytische Spezifität

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. World Health Organization 2011. Pertussis. <http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/index.html>. Aufgerufen am 21.05.2013.
2. Centers for Disease Control and Prevention 2013. 2012 Provisional Pertussis Surveillance Report. <http://www.cdc.gov/pertussis/downloads/Provisional-Pertussis-Surveillance-Report.pdf>. Aufgerufen am 21.05.2013.
3. Linneman CC und Perry EB. *Bordetella parapertussis*. Recent experience and a review of the literature. Am J Dis Child. 1977, 131 (5): 560-563.
4. Mertsola, J. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. Eur J Clin Microbiol. 1985, 4(2): 123-128.
5. Cherry JD und Seaton BL. Patterns of *Bordetella parapertussis* Respiratory Illnesses: 2008–2010.
6. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in Nasopharyngeal Samples from French Patients with Suspected Pertussis. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in J. Clin Microbiol 2011, 49(12):4347-4348.
7. Robert Koch Institut 2013. Pertussis (Keuchhusten). RKI-Ratgeber für Ärzte 2010. Aufgerufen am 21.05.2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention 2012. Pertussis. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th Edition Second Printing (May 2012). Aufgerufen am 21.05.2013.
9. Riffelmann M et al. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. J Clin Microbio. 2005, 43(10): 4925-4929.
10. Zhang X et al. Lack of Cross-protection against *Bordetella holmesii* after Pertussis Vaccination. Emerg Infect Dis 2012, 18(11): 1771-1779.