Evaluierung der Einzelserumdiagnose nach Influenza-Infektionen

Evaluation of Single Serum Diagnosis after Influenza Infections

Gabriele Döller, H.-J. Gerth

Abteilung für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Hygiene-Institut, Tübingen

Zusammenfassung:

Wir verglichen die diagnostische Wertigkeit der typspezifischen Komplementbindungsreaktion (KBR) mit einem typspezifischen indirekten Enzymimmunttest (ELISA) und einem subtypspezifischen indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) in der serologischen Influenza-Diagnostik, wobei KBR und IFT, im Gegensatz zum ELISA, nicht automatisierbar sind. Die Eignung dieser Methoden zur Einzelserumdiagnose wurde ermittelt.

Grenztiter zur Erkennung einer frischen bzw. nur kurze Zeit zurückliegenden Influenza-Infektion wurden festgelegt. Die Spezifität wurde mit 103 Prä-Epidemieseren errechnet. Die Sensitivität wurde mit 62 Seren von 31 Patienten mit einer gesicherten Influenza-A-Infektion und mit 60 Seren von 30 Patienten mit einer gesicherten Influenza-B-Infektion ermittelt. Die Influenza-Infektionen waren durch einen signifikanten Titeranstieg in der KBR gesichert. Unter Berücksichtigung des oberen Grenztiters (Angaben in Klammern) wurden folgende Ergebnisse hinsichtlich Spezifität/Sensitivität erhalten: Influenza A: KBR (1: ≥ 80) 99%/64%, IFT-IgG (1: ≥ 2560) 95,1%/83,8%, IFT-IgA (1: ≥ 160) 99%/77,5%, ELISA-IgG (1: ≥ 6400) 100%/64,5%, ELISA-IgA (1: ≥ 200) 88,0%/81,5%; und für Influenza B: KBR (1: ≥ 160) 100%/72,5%, IFT-IgG (1: ≥ 5120) 100%/72,5%, IFT-IgA (1: ≥ 160) 100%/85,3%, ELISA-IgG (1: ≥ 6400) 100%/90,6%, ELISA-IgA (1: ≥ 800) 96,1%/87,9%.

Schlüsselwörter:

Serodiagnose Influenza A – Serodiagnose Influenza B – KBR – IFT – ELISA – IgG-, IgA-, IgM-Antikörper – Subtyp-Spezifität – Typ-Spezifität

Summary:

We compared the diagnostic value of a type specific complement fixation test (CFT) with a type specific indirect enzyme immunoassay (ELISA) and a subtype specific indirect immunofluorescence test (IFT) in serological influenza diagnosis. In contrast to an ELISA, CFT and IFT are not suitable for automation. The feasibility of single serum diagnosis by these methods was examined. Borderline titers for recognition of acute or recent influenza infection were determined; specificity was calculated with 103 pre-epidemic sera. Sensitivity was determined by 62 sera of 31 patients with confirmed influenza A infections and by 60 sera of 30 patients with confirmed influenza B infections with different borderline titers. Using the upper borderline titers (in brackets) we obtained the following results in regard to specificity/sensitivity: Influenza A: CFT (1: ≥ 80) 99%/64%, IFT-IgG (1: ≥ 2560) 95,1%/83,8%, IFT-IgA (1: ≥ 160) 99%/77,5%, ELISA-IgG (1: ≥ 6400) 100%/64,5%, ELISA-IgA (1: ≥ 200) 88,0%/81,5%; and for influenza B: CFT (1: ≥ 160) 100%/72,5%, IFT-IgG (1: ≥ 5120) 100%/72,5%, IFT-IgA (1: ≥ 160) 100%/85,3%, ELISA-IgG (1: ≥ 6400) 100%/90,6%, ELISA-IgA (1: ≥ 800) 96,1%/87,9%.

Keywords:

Serodiagnosis influenza A – serodiagnosis influenza B – CFT – IFT – ELISA – IgG, IgA, IgM antibodies – subtype specificity – type specificity

Einleitung

Zur serologischen Diagnose einer Influenza werden auch heute noch in vielen Laboratorien die typspezifische Komplementbindungsreaktion (KBR) und/oder der stamm- bzw. subtypspezifische Hämagglutinationshemmtest (HHT) eingesetzt. Bei Vorliegen eines Serumpaars sind diese konventionellen Methoden zum Erkennen einer akuten bzw. kurze Zeit zurückliegenden Influenza-Infektion auch ausreichend. In der Praxis sind jedoch Serumpaare oft nicht vorhanden bzw. Erstseren werden häufig erst sehr spät nach Auftreten der Krankheitssymptome abgenommen; so daß ein Titeranstieg

nicht mehr festgestellt werden kann. Dennoch kann versucht werden, in diesen Fällen eine Verdachtsdiagnose mit einer Einzelserumuntersuchung zu bestätigen.

Wir berichteten bereits über den Vergleich eines subtypspezifischen Immunfluoreszenztests (IFT) mit der KBR in der Influenza-Diagnostik, wobei gezeigt werden konnte, daß der IFT bei Seren mit niedrigen, nur schwer interpretierbaren KBR-Titern (1:20 oder 1:40) hilfreich ist (Döller et al., 1986) (1, 2). Ein Nachteil beider Tests ist, daß sie nicht automatisiert werden können.

Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluierung der diagnostischen Wertigkeit eines automatisierbaren typspezi-

Entdecken Sie den Unterschied.
BETA-2-M-ELISA von medac.

medac Hamburg

Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH · Fehlandtstraße 3 · D-2000 Hamburg 36
Tel. 040/350902-0 · Fax 040/350902-61

Hämatologie-Systeme in der Praxis:

Nach dem Kauf die Nagelprobe.

Hämatologie-Systeme sind keine Maschinen, die - einmal am Netz - praktisch wartungsfrei und unbeaufsichtigt arbeiten können. Es sind vielmehr komplexe Meßsysteme, die von Fachleuten bedient und von Fachleuten versorgt und gewartet werden müssen.

Darum endet auch eine Geschäftsbeziehung nicht mit dem Kauf eines Systems. Ganz im Gegenteil:

Hämatologie-Anwender wissen, daß sich die Qualität der Geschäftsbeziehung (und damit die Richtigkeit der Kaufentscheidung) erst **nach** dem Kauf erweist.

Stellen Sie daher rechtzeitig, d.h. vor dem Kauf, sicher, daß Sie danach nicht allein gelassen werden. Lassen Sie sich ein perfektes und bewährtes Service-System nachweisen, das Sie weder heute noch nach Jahren im Stich läßt.

Das ist Ihr gutes Recht. Fordern Sie es ein!

Für die DIGITANA ist diese Forderung Verpflichtung.

- Mit dem Angebot von Sysmex Hämatologie-Systemen, deren Genauigkeit, Zuverlässigkeit und einfache Bedienung weltweit Maßstäbe gesetzt hat.
- Mit einem lückenlosen Angebot vom Basisgerät (Ery, Leuko, Hb) bis hin zum Differenzier-Automaten und Flow-Zytometer.
- Mit einem dichten Netz von Service- und Beratungszentren in Deutschland und der Schweiz.
- Mit einem Stab von System-Beratern, die - aus der Praxis kommend - Ihnen individuell beistehen und Sie streng praxisorientiert (nicht provisorienorientiert) informieren und beraten.
- Mit einer wissenschaftlichen Leitung, die Mitarbeiterschulung, Anwenderkurse und Weiterbildung anbietet und in engem Kontakt mit Standesorganisationen und medizinischen Fachgesellschaften Trends der Hämatologie mitbestimmt.

Damit beste Systeme auch in der Praxis Bestes leisten.

DIGITANA AG

Ganz genau und zuverlässig.

D - 2000 Hamburg 76 · Weidestraße 118 b · Tel.: 040 / 270 70 50
CH - 8810 Horgen · Burghaldenstrasse 11 · Tel.: 01 / 725 61 91

fischen indirekten Enzymimmuntests (ELISA) im Vergleich zum IFT an Seren von Patienten, deren Influenzavirusinfektion klinisch wahrscheinlich war und die serologisch durch einen signifikanten Titeranstieg in der KBR bestätigt wurde.

Material und Methoden

Enzymimmuntest

0,1 ml Influenza-A- und -B- sowie Kontroll-Antigen für die KBR (Behringwerke AG, Marburg), 1:32 verdünnt in 0,001 M Carbonatpuffer (pH 9,3) wurden in die Vertiefungen von Polystyrolchlorid-Mikrotiterplatten (Nunc, maxisorb plate; Nunc, Wiesbaden) gegeben und über Nacht bei +4°C inkubiert. Die Absättigung der freien Bindungsstellen erfolgte durch Zusatz von 0,01 ml Kälberserum pro Vertiefung über Nacht bei +4°C. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS (phosphate buffered saline; pH 7,2) erfolgte die Zugabe des zu testenden Humanserums, verdünnt in 5% (v/v) Kälberserum/PBS. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei 37°C. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Vertiefungen mit PBS erfolgte die Zugabe von 0,05 ml Peroxidase markierten anti-human-IgG, -IgA oder -IgM (1:1000 [anti-human-IgG] bzw. 1:500 [anti-human-IgM und -IgA] verdünnt in 5% [v/v] Kälberserum/5% [w/v] BSA/PBS, Fa. DAKO, Vertrieb Boehringer, Ingelheim) pro Vertiefung. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen. Gebundene enzymmarkierte Antikörper wurden durch die Zugabe von 0,05 ml Substrat pro Vertiefung nachgewiesen. Als Substrat wurde 1 mg 1,2-Phenylendiamin (Fa. Fluka, Buchs/Schweiz) pro ml 0,01 M Phosphatpuffer (pH 6) unter Zusatz von 0,001% H₂O₂ verwendet. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde mit 0,1 ml H₂SO₄ pro Vertiefung (IgG-ELISA: nach 4 Minuten; IgA-ELISA: nach 6 Minuten; IgM-ELISA: nach 8 Minuten) gestoppt.

Die Anfangsverdünnung der Seren betrug 1:100. Für den IgG-ELISA wurde in vierfachen Verdünnungsstufen titriert und für den IgA- und IgM-ELISA in zweifachen Verdünnungsstufen.

Der „Titer“ wurde als die Serumverdünnung definiert, bei der noch eine OD-Differenz $\geq 0,2$ zwischen der Bindungsreaktion des zu testenden Serums mit Antigen- und mit Kontrollantigen bei einer Wellenlänge von 490 nm (Dynatech MR 5000, Fa. Dynatech Denkendorf) bestand.

Immunfluoreszenztest

Für den Nachweis subtypspezifischer Antikörper wurde ein Immunfluoreszenztest verwendet, der bereits ausführlich beschrieben worden ist (Döller et al., 1985; Döller et al., 1986).

Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde mit kommerziell erhältlichem Influenza-A- und -B-Antigen für die KBR (Behringwerke AG, Marburg) nach einer Standardmikromethode durchgeführt (Lennette und Schmidt, 1979).

Patientenserum

62 Seren von 31 Patienten, bei denen eine Influenza-A-Infektion durch einen signifikanten Titeranstieg in der KBR nachgewiesen worden war, und 60 Seren von 30 Patienten, bei denen eine Influenza-B-Infektion durch einen signifikanten Titeranstieg in der KBR nachgewiesen worden war, wurden vergleichend in der KBR, dem IFT und dem ELISA untersucht. Die Abnahme des Zweitserums

Tabelle: Berechnung der Spezifität und Sensitivität von KBR, IgG-IFT, IgA-IFT, IgG-ELISA und IgA-ELISA mit verschiedenen Grenztitern.

Test	rezip. Titer*	Spezifität	Sensitivität	rezip. Titer**	Spezifität	Sensitivität
Influenza A:		(n = 103)	(n = 62)		(n = 103)	(n = 62)
KBR:	≥ 80	99,0%	64,0%	≥ 40	88,0%	81,5%
IFT-IgG:	≥ 2560	95,1%	83,8%	≥ 1280	59,2%	96,9%
IFT-IgA:	≥ 160	99,0%	77,5%	≥ 80	97,1%	79,4%
ELISA-IgG:	≥ 6400	100,0%	64,5%	≥ 1600	100,0%	91,1%
ELISA-IgA:	≥ 200	88,0%	81,5%	≥ 100	88,0%	91,1%
Influenza B:		(n = 103)	(n = 60)		(n = 103)	(n = 60)
KBR:	≥ 160	100,0%	72,5%	≥ 80	96,1%	78,4%
IFT-IgG:	≥ 5120	100,0%	72,5%	≥ 2560	95,1%	90,6%
IFT-IgA:	≥ 160	100,0%	85,3%	≥ 80	90,3%	90,6%
ELISA-IgG:	≥ 6400	100,0%	90,6%	≥ 1600	99,0%	96,7%
ELISA-IgA:	≥ 800	96,1%	87,9%	≥ 400	96,1%	87,9%

rezip. Titer* = oberer Grenztiter

rezip. Titer** = unterer Grenztiter

erfolgte zwischen Tag 5 und 31 nach der Erstserumabnahme. Die Seren waren zwischen 1983 und 1991 gesammelt worden und entweder sofort nach Eintreffen im Laboratorium untersucht oder bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert worden.

Für die Bestimmung der Spezifität nach Galen und Gambino (1979) wurden 103 Blutspendenserum untersucht. Die Seren sind im Januar 1985 vor Beginn der damaligen Influenza-Aktivität abgenommen worden.

Ergebnisse

Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

Die Ergebnisse der Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnung für einen oberen und einen unteren „Grenztiter“, der auf eine kurze Zeit zurückliegende Influenzavirusinfektion hindeutet, sind in der Tabelle dargestellt.

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß zum Nachweis von Antikörpern gegen Influenza A der IFT-IgG mit einer Sensitivität von 83,8% (oberer Grenztiter) resp. 96,9% (unterer Grenztiter) die besten Ergebnisse zeigte, hingegen war der Nachweis von Antikörpern gegen Influenza B mit dem ELISA-IgG mit einer Sensitivität von 90,6% (oberer Grenztiter) resp. 96,7% (unterer Grenztiter) am zuverlässigsten. In allen Testsystemen wurde ein Spezifitätsverlust von 0 bis 11% zwischen den beiden Grenztitern beobachtet mit Ausnahme des Influenza-A-IgG-IFT, der mit dem oberen Grenztiter eine Spezifität von 95,1% und mit dem unteren Grenztiter eine Spezifität von nur 59,2% aufzeigte.

Diskussion

Im allgemeinen ist die Einzelerumdiagnose bei häufig vorkommenden viralen Erkrankungen von einer guten Information von seiten des behandelnden Arztes abhängig. Wichtige benötigte Informationen wie Tag des Erkrankungsbeginns mit klinischen Erscheinungsbildern sind für die Interpretation des Befundes bei einer Einzelerumdiagnose unerlässlich. Innerhalb dieser Studie wurde die diagnostische Wertigkeit einer typ- bzw. subtypspezifischen Immunantwort nach natürlicher Influenza-Infektion ermittelt. Ziel der Studie war es, die Effektivität von KBR, ELISA und IFT bei einer Einzelerumdiagnose zu evaluieren. Dazu wurden die Grenztiter, die auf eine akute oder kürzlich stattgefundene Influenza-Infektion hindeuten, unter Berücksichtigung der Titer von Prä-Epidemie-

ren angenommen. IgM-Antikörper wurden nicht berücksichtigt, da von mehreren Autoren nur unregelmäßiges Auftreten von spezifischen IgM-Antikörpern nach Influenza-Infektion beschrieben worden war (Julkunen et al., 1985; Harmon et al., 1986; Koskinen et al., 1987). Bei allen Influenza-A-Patienten war innerhalb dieser Studie mit dem IFT eine Influenza A/H3N2-Infektion diagnostiziert worden.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß für die serologische Diagnose einer Influenza-A-Infektion der IgG-IFT mit einer Sensitivität von 83,8% resp. 96,9% bei einer Einzelsерumdiagnose innerhalb von 31 Tagen nach Auftreten der ersten Krankheitszeichen am geeignetsten war.

Überraschenderweise war für die Diagnose einer Influenza-A-Infektion der IgG-ELISA bei Verwendung des oberen Grenztiters der KBR nur geringfügig überlegen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu bisher erschienenen Arbeiten (Julkunen et al., 1985; Masihi und Lange, 1980; Joassin et al., 1983). Hier muß jedoch berücksichtigt werden, daß wir aus Praktikabilitätsgründen für den IgG-ELISA vierfache Verdünnungsstufen ausgewählt hatten. Die Anwendung einer Verdünnung von z. B. 1:3200 hätte mit großer Wahrscheinlichkeit bessere Ergebnisse gebracht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die wir für den Nachweis von Antikörpern gegen Influenza-A-Virus erhalten haben, ist der Influenza-B-IgG-ELISA mit einer Sensitivität von 90,6% resp. 96,7% allen anderen Testsystemen überlegen. Die schlechtesten Ergebnisse wurden mit der KBR und dem IgG-IFT erhalten. Ähnliche Beobachtungen bezüglich der KBR sind auch von anderen Autoren beschrieben worden (Julkunen et al., 1985).

Die Spezifität aller Testsysteme war erwartungsgemäß höher bei Verwendung des oberen Grenztiters im Gegensatz zu dem unteren Grenztiter. Nur in einem Testsystem (Influenza A/H3N2-IFT-IgG) war eine große Differenz zwischen den Spezifitäten beider Grenztiter beobachtet worden. Dies ist das einzige Testsystem, bei dem nur eine einzige Titerstufe (1:1280: niedriger Grenztiter; 1:2560: hoher Grenztiter) von Bedeutung für die Diagnose einer kürzlich stattgefundenen Influenza-A-Infektion ist.

Aufgrund der Ergebnisse zogen wir den Schluß, daß die Einzelsерumdiagnose einer Influenza-A-Infektion mit dem IgG-IFT und einer Influenza-B-Infektion mit dem IgG-ELISA mit relativ großer Treffsicherheit möglich ist.

Schrifttum:

1. DÖLLER, G., DÖLLER, P. C., GERTH, H.-J.: Diagnostic significance of influenza sub-type-specific IgG, IgA, and IgM antibodies. *J. Biol. Stand.* 14, 163-175 (1986).
2. DÖLLER, G., DÖLLER, P. C., GERTH, H.-J.: Serologische Diagnostik von Influenza A- und B-Infektionen mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion und der indirekten Immunfluoreszenztechnik. *Lab.med.* 10, 291-296 (1986).
3. DÖLLER, P. C., DÖLLER, G., GERTH, H.-J.: Immunofluorescence test with antigen loaded erythrocytes: detection of influenza virus specific IgG, IgA, and IgM antibodies. *Med. Microbiol. Immunol.* 173, 291-302 (1985).
4. GALEN, R. S., GAMBINO, S. R.: Norm und Normabweichung klinischer Daten. G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 85 (1985).
5. HARMON, M. W., PHILLIPS, D. J., REIMER, C. B., KENDAL, A. P.: Isotype-specific immunoassay for influenza antibody with monoclonal antibodies to human immunoglobulins. *J. Clin. Microbiol.* 24, 913-916 (1986).
6. JOASSIN, L., REGINSTER, M., VAIRA, D.: Anti M-protein antibody response to type A or B natural influenza detected by solid phase enzyme linked immunosorbent assay and by complement fixation. *Arch. Virol.* 76, 15-23 (1983).
7. JULKUNEN, I., PYHÄLÄ, R., HOVI, T.: Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. *J. Virol. Meth.* 10, 75-84 (1985).
8. KOSKINEN, P., VUORINEN, T., MEURMAN, O.: Influenza A and B virus IgG and IgM serology by enzyme immunoassays. *Epidem. Inf.* 99, 55-64 (1987).
9. LENNETTE, E. H., SCHMIDT, N. J.: Complement-fixation (CF) test. In: LENNETTE, E. H., SCHMIDT, N. J. (eds.). *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 5th Edition. Washington DC, American Public Health Association, 35-42 (1979).
10. MASIHI, K., LANGE, W.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of influenza type-specific antibodies. *J. Immunol. Meth.* 36, 173-179 (1980).

Acknowledgement

Wir danken Edeltraud Faigle und Monika Kuhar für ausgezeichnete technische Assistenz. Die Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie unterstützt (01Z87052). Die Verantwortung für den Inhalt der Arbeit liegt bei den Autoren.

Standardisierte Reagenzien für mikrobiologische Laboratoriums-Arbeiten

dehydrierte sowie Fertigmedien, Gewebezuchtmaterialien, Seren und Reagenzien

Resistenz-Blättchen, Carbohydrate, Farbstoffe, Antigene und Seren, Dispenser, FA-Reagenzien, Peptone, Hydrolysate, Indikatoren, Extrakte, Biochemikalien, Aminosäuren, Enzyme, serolog. Tests sowie klinische Reagenzien und Anreicherungsmedien.

DIFCO-Produkte werden routinemäßig in der ganzen Welt verwendet, wo mikrobiologische Arbeiten stattfinden.

Sie wurden speziell geschaffen für die klin.-chem. Laboratorien in Krankenhäusern, Hygiene-Institute, Gewebezucht-Laboratorien, Gesundheitsämter - für Wasser- und Abwasserkontrollen, Milch- und Lebensmitteluntersuchungen, Qualitätsüberwachung in der chem.-pharm. Industrie, Erziehungs- und Ausbildungsinstitute.

ISMUNIT

Virus-Antigene und Sera, Agglutino-Teste

Auf Wunsch Listen und Spezial-Literatur.

Heinrichstraße 5 · 2000 Hamburg 50
Tel. 040/432827 · Fax 040/432830

Spezial-Importeur für Labor-Präparate

Anschrift der Verfasser:

Dr. Gabriele Döller
Prof. Dr. H.-J. Gerth
Hygiene-Institut
Abt. f. Med. Virologie u. Epidemiologie der Viruskrankheiten
Sicherstraße 7
7400 Tübingen

DIMENSION[®] SMS

Immer ein Schritt voraus: ...flexibel, zuverlässig, einfach

Große Flexibilität bietet das neue System durch zehn frei programmierbare Kanäle. Für Bestimmungen, die Du Pont zur Zeit noch nicht anbietet, können problemlos Reagenzien Ihrer Wahl verwendet werden.

Positive Probenidentifikation auf unterschiedlichen Primärgefäßen bei einfachster Handhabung kennzeichnen den **Dimension[®] SMS**. Sie können jederzeit jede Probe bearbeiten, Notfälle einschieben und Kontrollen fahren - ohne Zeitverlust, ohne Umrüsten.

39 Methoden decken mehr als 90 % der Testanforderungen in der Routine ab.

Hohe Zuverlässigkeit in der Datenerfassung bringt der neuartige Barcode-Leser. Alle gängigen Barcodes können verwendet werden.

Wann sehen Sie sich Ihren **Dimension[®] SMS** näher an? Anruf genügt!

Wir führen Ihnen das System gerne vor.
Tel.: 0 61 72 / 87 25 35

Produktbereich Diagnostika

Unsere Produkte für die Influenza-Diagnostik

EIMMUN-Influenza Typ-spezifischer Enzymimmuntest (ELISA) zum Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen Influenza A und B

FLUORIMMUN-Influenza Typ- oder Subtyp-spezifischer indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen Influenza A, bzw. A/Subtyp H1/N1 oder Subtyp H3N2 und Influenza B.

D-7955 Ochsenhausen
Schloßstraße 9

LABOR
DR. KOCH — DR. MERK
GMBH

Telefon (07352) 34 00
Telefax (07352) 48 34