



Gebrauchsinformation für FLUORIMMUN-Aspergillus

Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) für
Aspergillus-IgA, -IgM und -IgG Antikörperbestimmung
Best.-Nr.: FA-100
Ausgabe: 2003-11

Diagnostische Bedeutung

Bei der Aspergillose muss zwischen der allergischen Form, dem pulmonalen Aspergillom und der invasiven Form auch im Hinblick auf die serologische Diagnostik unterschieden werden. Trotz des ubiquitären Vorkommens der Aspergillussporen findet keine Stimulation des spezifischen Immunsystems ohne Infektion statt. Nachzuweisende Antikörper lassen demnach auf eine durchgemachte oder akute Infektion schließen. Bei den vielfältigen Aspergillus-Erkrankungen bieten serologische Untersuchungen bei weitgehend immunkompetenten Patienten eine wichtige Hilfestellung z. B. bei der Überwachung von mykosegefährdeten Risikopatienten. In der Serodiagnostik von Aspergillus-Infektionen sind der indirekte Hämagglutinationstest sowie die Immundiffusion weit verbreitet. Sie ermöglichen eine erste grobe Quantifizierung der Immun-Antwort. Der FLUORIMMUN-Aspergillus bietet zusätzlich eine differenzierte Betrachtung der Immunantwort durch Unterscheidung der Immunglobulinklassen IgA, IgM und IgG.

Testprinzip

Indirekter Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis von Aspergillus-IgA-, -IgM- und -IgG-Antikörpern im Serum. Grundlage des Tests ist die Bindung Aspergillus-spezifischer Antikörper an mit Aspergillus-Antigen beschichtete Hühner-Erythrozyten auf Objektträgern. Der Bindungsnachweis erfolgt durch FITC-markierte Anti-human-IgA-, Anti-human-IgM- bzw. Anti-human-IgG-Antikörper. Bei dem Aspergillus-Antigen handelt es sich um Polysaccharide aus *Aspergillus fumigatus* mit mehreren serologisch aktiven Komponenten. Sie erfassen Antikörper, die gegen die Zellwandantigene des Pilzes gerichtet sind.

Gefahrenhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die Laborvorschriften für die Handhabung von infektiösem Material!

Das Aspergillus-Antigen zur Beschichtung der Hühner-Erythrozyten wurde chemisch inaktiviert.

Die Kontrollseren sind im HIV-, HCV-Antikörpernachweis und HB_S-Ag-Test negativ.

Dennoch müssen alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien grundsätzlich als **potentiell infektiös** angesehen und entsprechend behandelt und entsorgt werden.

Testpackung

Die Testpackung ist ausreichend für 96 Bestimmungen und enthält folgende Komponenten:

Reagenz	Best.-Nr.
8 Objektträger mit je 12 Auftragsfeldern. Auf jedem Auftragsfeld befindet sich ein Gemisch aus mit Aspergillus-Antigen beschichteten Erythrozyten (20 %) und unbeschichteten Kontroll-Erythrozyten (80 %).	FA-512
positives Kontrollserum lyophilisiert, enthält 0,01 % Merthiolat; Titerangaben und Verdünnung siehe „Titerblatt“	FA-150
negatives Kontrollserum 0,2 ml, enthält 0,01 % Merthiolat, gebrauchsfertig	FA-125
Anti-human-IgA-Konjugat FITC-markiert mit Evans blue, lyophilisiert, Flasche für 0,5 ml	FI-001
Anti-human-IgG-Konjugat FITC-markiert mit Evans blue, lyophilisiert, Flasche für 0,5 ml	FI-002
Anti-human-IgM-Konjugat FITC-markiert mit Evans blue, lyophilisiert, Flasche für 0,5 ml	FI-003
Phosphat-Puffer-Konzentrat 20fach konz., 3 Flaschen mit je 7 ml	P-040
Einbettungsmedium Flasche mit 1,5 ml, gebrauchsfertig	FI-007

Die Reagenzien und Objektträger sind auch einzeln zu beziehen. Bei Verwendung von Einzelreagenzien ist eine Standardisierung im Anwender-Labor erforderlich.

Zusätzlich erforderliches Material

Fluoreszenz-Mikroskop (Auflicht, Filterkombination für FITC)

Brutschrank, feuchte Kammer

Färbewännchen

Magnetrührer

Aqua dem. und steriles Aqua dem.

Rheumafaktor-Adsorbens wird zur IgM-Antikörper-Bestimmung benötigt.

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

Lagerung der Objektträger und Reagenzien bei + 2 °C bis + 8 °C.

Verwendbar bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum.

Die Objektträger sind nach erstmaligem Öffnen der Packung eine Woche haltbar.

Lyophilisierte Reagenzien sind nach Auflösung bei + 2 °C bis + 8 °C einen Monat lang verwendbar.

Rekonstituiertes und nicht verbrauchtes Kontrollserum portioniert bei - 20 °C lagern und innerhalb von drei Monaten aufbrauchen. Mehrmaliges Auftauen vermeiden.

Vorbereitung der Reagenzien

Lyophilisierte Konjugate mindestens 1 Stunde vor Gebrauch in sterilem Aqua dem. lösen.

Positives Kontrollserum	Lyophilisat mit 0,2 ml Aqua dem. rekonstituieren
Anti-human-IgA-Konjugat	Lyophilisat mit 0,5 ml Aqua dem. rekonstituieren
Anti-human-IgG-Konjugat	
Anti-human-IgM-Konjugat	
PBS-Pufferkonzentrat	1:20 mit Aqua dem. verdünnen (z. B. 7 ml Puffer-Konzentrat + 133 ml Aqua dem.)

Testdurchführung

Der Test kann zum qualitativen oder quantitativen Nachweis von IgA-, IgM-, IgG-Antikörpern auf einem Objektträger ausgeführt werden. Dazu werden unterschiedliche Verdünnungen der Seren eingesetzt.

Für die IgM-Bestimmung Seren vorher mit Rheumafaktorabsorbens behandeln !

	Qualitativ =Screening	Quantitativ
Antikörper	Verdünnung in PBS	Verdünnungen in PBS
IgG	1:40	1:40, 1:160 und 1:640
IgM*	1:10 (1:10 nach Voradsorption mit Rheumafaktor-Adsorbens)	1:10, 1:40 und 1:160
IgA	1:10	1:10, 1:40 und 1:160

1. Patientenseren verdünnen wie oben angegeben
2. Positives Kontrollserum (nach Rekonstitution 1:10 vorverdünnt) entsprechend den Angaben auf dem beiliegenden Titerblatt in PBS weiterverdünnen.
3. Negatives Kontrollserum unverdünnt einsetzen.
4. 10 µl Kontroll- oder Patientenserum pro Feld pipettieren.
Pro Ansatz je 1 Feld für das positive und negative Kontrollserum ansetzen.
5. 90 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
6. Waschen der Objektträger: Objektträger gründlich zuerst mit PBS und anschließend mit Aqua dem. vorsichtig abspülen, wobei ein starker Wasserstrahl vermieden werden muss. Bei Verwendung einer Spritzflasche nicht direkt auf die beschichteten Felder spritzen, sondern auf die dazwischen liegenden Stege. Alternativ kann so verfahren werden: Objektträger kurz 1 x in PBS tauchen, 10 min in einem Färbewännchen mit Magnetprüher (800 Upm) in PBS inkubieren. Danach in einem zweiten Färbewännchen mit Aqua dem. 1 min auf Magnetprüher (800 Upm) inkubieren.
Nach dem Waschen werden die Objektträger luftgetrocknet oder mit dem Fön getrocknet, dabei den warmen Luftstrom nicht länger auf eine Stelle richten.
7. Je 10 µl Anti-human-IgA- bzw. IgM-, bzw. IgG-Konjugat auf das entsprechende Feld pipettieren.
8. 60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
9. Waschen und trocknen (siehe 6.).
10. Einbetten mit Einbettungsmedium, Deckglas auflegen.

Ableesen der Ergebnisse

Objektträger unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Auflicht, Filterkombination für FITC) bei 200- bis 400-facher Vergrößerung mikroskopieren.

Eine Ablesehilfe mit Fotos ist auf Anfrage erhältlich.

stark positiv +++	Strahlend leuchtende, gelbgrüne Fluoreszenz der mit Aspergillus-Antigen beschichteten Erythrozyten; negative Kontroll-Erythrozyten sind rot
positiv ++	Leuchtende, gelbgrüne Fluoreszenz der mit Aspergillus-Antigen beschichteten Erythrozyten; negative Kontroll-Erythrozyten sind rot
schwach positiv +	= Titer ; schwache aber noch deutliche, gelbgrüne Fluoreszenz der mit Aspergillus-Antigen beschichteten Erythrozyten; negative Kontroll-Erythrozyten sind rot
negativ	keine Fluoreszenz, alle Erythrozyten erscheinen rot

Interpretation der Ergebnisse

Folgende FLUORIMMUN-Aspergillus-Antikörpertiter im Serum sind als **verdächtig für Aspergillose anzusehen**:

IgG \geq 1:40 oder IgM \geq 1:10 oder IgA \geq 1:10

Wiederholungsuntersuchungen und sorgfältige, klinische Abklärung sind angezeigt. IgM-Antikörper werden allgemein als Hinweis für eine akute oder kurz zurückliegende Infektion betrachtet; IgA-Antikörper treten häufig in Kombination mit IgM- und IgG-Antikörpern auf.

IgG-Antikörper sind im Gegensatz zu IgM- und IgA-Antikörpern länger nachweisbar; in der Normalbevölkerung jedoch nur vereinzelt.

Wichtig:

Ein negativer Antikörper-Nachweis (IgG, IgM und IgA) ist bei immunsupprimierten Patienten kein Ausschlusskriterium für Aspergillose. Eine sorgfältige klinische Abklärung und weitere diagnostische Maßnahmen (Antigennachweis, Kultur u. a. Methoden) sind angezeigt.

Fehlerhinweise

Sollten im Mikroskop grau-grünliche Schleier über das ganze Blickfeld zu erkennen sein, wurden die Objektträger nicht gründlich genug gewaschen. Ebenso ist ein Auftreten von **sehr vielen** hell fluoreszierenden Körnchen zwischen den rot erscheinenden Erythrozyten ein Hinweis auf ungenügendes Waschen. In diesem Fall sollte der Test wiederholt werden, da eventuell auch unspezifische Serumbestandteile nicht abgewaschen wurden, die zu falschen Ergebnissen führen können.

Die Ablesung darf nicht im Randbereich des Objektträgerfeldes erfolgen, da hier unspezifische Fluoreszenz auftreten kann.

Lyophilisierte IgA-, IgM-, bzw. IgG-Konjugate mindestens 1 Stunde vor Gebrauch lösen. Das positive Kontrollserum ist bereits 1:10 vorverdünnt.

Grenzen des Verfahrens

Eine endgültige klinische Diagnose darf nicht auf den Resultaten einer einzelnen diagnostischen Methode erstellt werden. Der Arzt muss die Anamnese und alle klinischen und Laborbefunde des Patienten berücksichtigen.

Mikrobielle Kontamination oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben kann die Messergebnisse verfälschen.