



Gebrauchsinformation für Aspergillus-IHT

Indirekter Hämagglutinationstest (IHT) zum Nachweis von Antikörpern
gegen Aspergillus-Arten
Best.-Nr.: KA-100
Ausgabe: 2009-02

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. Nachweisende 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 Aspergillus-IHT eignet sich zur Überwachung mykosegefährdeter Patienten und zur Früherkennung anlaufender Aspergillose.

Testprinzip

Das Antigen für den indirekten Hämagglutinationstest zum Nachweis von Antikörpern gegen Aspergillus-Spezies wird aus *Aspergillus fumigatus* gewonnen. Es handelt sich bei diesem Antigen um Polysaccharide mit mehreren serologisch aktiven Komponenten. Sie erfassen Antikörper, die gegen die Zellwand-Antigene des Pilzes gerichtet sind. Beim indirekten Hämagglutinations-Aspergillus-Antigen werden mit Aspergillus-Antigen beladene, formalinisierte Schaferythrozyten verwendet. Sie reagieren mit spezifischen Serumantikörpern und bilden sichtbare flächige Agglutinate.

Der indirekte Aspergillus-Hämagglutinationstest erfasst hauptsächlich Antikörper vom IgM-Typ. IgG-Antikörper werden teilweise erfasst.

Gefahrenhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die Laborvorschriften für die Handhabung von infektiösem Material!

Die Human-Kontrollseren sind auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HbsAg) sowie auf Antikörper gegen Hepatitis C-Virus (HCV), Human-Immundefizienz-Viren (HIV-1, HIV-2) und Humane T-Zellen-lymphotrope Viren (HTLV-1, HTLV-2) überprüft und negativ gefunden. Dennoch müssen alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien grundsätzlich als **potentiell infektiös** angesehen und entsprechend behandelt und entsorgt werden.

Die Kontrollseren enthalten Thimerosal als Konservierungsmittel. Alle Reagenzien sind nur zur *In-Vitro*-Diagnostik bestimmt.

Testmaterial

Inhalt der Packung

Mit Aspergillus-Antigen beladene formalinisierte Schaferythrozyten 5 x 8 ml lyophilisiert.

Zusätzlich erforderliches Material

Absorptionserothrozyten vom Schaf, Best.-Nr. KH-100

Positives Kontrollserum, human, Best.-Nr. KA-005

Negatives Kontrollserum, human, Best.-Nr. KA-010

Aqua dest.

Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl)

Mikrotestplatten mit Spitzboden

Mikropipetten mit Einmalspitzen

Röhrchen zur Probenverdünnung

Wasserbad

Vorbereitung, Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

a) Mit Aspergillus-Antigen beladene, formalinisierte **Schaferythrozyten**, Lyophilisat für 8 ml: mit 8 ml sterilem dest. Wasser rekonstituieren, gut mischen. Die entstehende 1 %ige Erythrozytensuspension ist gebrauchsfertig.

Haltbarkeit: ungeöffnet bei Raumtemperatur (15 – 20 °C), bis zum angegebenen Verfalldatum. Rekonstituiert, gut verschlossen, bei 2 – 8 °C, 7 Tage. Portioniert bei – 20 °C 2 Monate. Nicht wiederholt einfrieren.

b) Absorptionserothrozyten vom Schaf, Lyophilisat für 5 ml:

mit 5 ml sterilem dest. Wasser rekonstituieren, gut mischen. Es entsteht eine ca. 20 %ige Erythrozytensuspension.

Haltbarkeit: ungeöffnet, bei 2 – 8 °C, bis zum angegebenen Verfalldatum. Rekonstituiert, gut verschlossen, bei 2 – 8 °C, 14 Tage.

Vorbereitung der Kontrollerythrozyten: 0,1 ml Absorptionserothrozyten mit 1,9 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) versetzen, gut mischen. Die entstehende 1 %ige Kontrollerythrozytensuspension dient zur Prüfung des untersuchten Serums auf vollständige Absorption.

c) Kontrollserum positiv, human, Lyophilisat für 0,1 ml: mit 0,1 ml dest. Wasser rekonstituieren, gut mischen. Solltiter siehe Etikettenangabe.

Haltbarkeit: ungeöffnet, bei 2 – 8 °C bis zum angegebenen Verfalldatum. Rekonstituiert, gut verschlossen, bei 2 – 8 °C, 4 Wochen.

d) Kontrollserum negativ, human, Lyophilisat für 0,1 ml: mit 0,1 ml dest. Wasser rekonstituieren, gut mischen.

Haltbarkeit: ungeöffnet, bei 2 – 8 °C bis zum angegebenen Verfalldatum. Rekonstituiert, gut verschlossen, bei 2 – 8 °C, 4 Wochen.

Testdurchführung

Durchführung ohne Vorabsorption der Seren

Für die Ablesung sind Mikrotest-Platten mit Spitzboden am besten geeignet.

- 50 µl Patienten- und Kontrollserum mit 450 µl physiologischer Kochsalzlösung verdünnen (1:10). Bei Liquorentersuchungen beginnt die Verdünnungsreihe zweckmäßigerweise mit 1:2.
- Die Proben werden gemäß nachfolgendem Pipettierschema (a - e) im Test eingesetzt.
 - a – c Ab Kavität 3 je 50 µl physiologische Kochsalzlösung pro Kavität vorlegen. Aus dem bereits 1:10 verdünnten Patientenserum, bzw. dem 1:2 verdünnten Liquor, eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 herstellen.
 - d Zu jeder Verdünnung werden 50 µl der 1 %igen Antigensuspension gegeben.
 - e Zur Kontrolle des Patientensersums auf vollständige Absorption der Agglutinine werden zu 50 µl der Anfangsverdünnung (1:10) 50 µl Kontrollerythrozyten gegeben.

Ist die Serumkontrolle positiv (d. h. sind heterologe Antikörper vorhanden), so ist eine Vorabsorption der Seren notwendig und der Test muss wiederholt werden.

	Serum-Kontrolle	Serumverdünnung							
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
a) Physiologische Kochsalzlösung	-	-	50 µl vorlegen	50	50	50	50	50	50
b) Serum	50 µl	50	50	-	-	-	-	-	-
c) Titration	ab Kavität 3, je 50 µl in Kavität 4, 5, 6 usw. übertitrieren, gut mischen								
d) Antigensuspension	-	50 µl	50	50	50	50	50	50	50
e) Kontrollerythrozyten-suspension	50 µl	-	-	-	-	-	-	-	-

Antigenkontrolle: Zur Kontrolle des Antigens auf Spontanagglutination werden zu 50 µl physiologischer Kochsalzlösung 50 µl Antigensuspension gegeben. Wird nur einmal für jeden Gesamtansatz gebraucht.

- Den Ansatz durch vorsichtiges Schütteln der Platten mischen und abdecken.
- Inkubation: 2 Stunden bei 37 °C. Eine **vorläufige Beurteilung** ist bereits nach dieser Inkubation möglich; die **Endablesung** erfolgt, nach Inkubation im Kühlschrank bei 2 – 8 °C, am nächsten Tag. Den Testansatz nicht mehr aufschütteln.

Durchführung mit Vorabsorption der Seren

- 50 µl unverdünntes Patientenserum und 550 µl 20 %ige Schaferythrozyten-Suspension in ein Zentrifugenröhrchen geben. Gut mischen, 30 Minuten bei 50 °C im Wasserbad inkubieren. Dann 10 Minuten bei ca. 3000 UpM abzentrifugieren.
- Das im Überstand in einer Verdünnung von 1:10 vorliegende Serum wird abgehoben und im Test eingesetzt (siehe obiges Pipettierschema).

Sollte die Serumkontrolle nach Vorabsorption der Seren noch immer positiv reagieren, werden nunmehr 0,05 ml Patientenserum mit 1,1 ml der 20 %igen Schaferythrozyten-Absorptionssuspension versetzt, wie oben beschrieben inkubiert und erneut im Test eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass die Anfangsverdünnung des Serums nunmehr 1:20 ist.

Beurteilung

Positive Reaktion: flächiges Agglutinat

Negative Reaktion: Sedimentation der Erythrozyten (Knopfbildung)

Die Seren können beurteilt werden, wenn:

1. die Antigen-Kontrolle negativ ausfällt, d. h. keine unspezifische Agglutination vorliegt.
2. die Serumkontrolle negativ ausfällt, d. h. unspezifische Agglutinine vollständig absorbiert wurden.

Als **Aspergillus-Hämagglutinationstiter** wird jene Serumverdünnung angegeben, bei der die mit Antigen beladenen Schaferythrozyten gerade noch zur Agglutination gebracht werden. Das heisst, dass noch keine vollständige Knopfbildung vorliegt und sichtbares Agglutinat an den Wänden der Vertiefung vorhanden ist. Hämagglutinationstiter im Serum von 1:20 und mehr sind als verdächtig für Aspergillose anzusehen. Wiederholungsuntersuchungen und sorgfältige klinische Abklärung sind angezeigt.

Leistungsbewertung des Aspergillus-IHT

Die mykologische Serodiagnostik ist ein wichtiger ergänzender diagnostischer Hinweis auf eine Pilzinfektion. Der alleinige Einsatz serologischer Methoden zur Erkennung einer Aspergillose ist schwierig. Die Antikörperbildung setzt immer die Reaktion des Erregers mit dem Wirt voraus, aber die Differenzierung einer Oberflächen- von einer tiefen Mykose kann oft nicht vorgenommen werden. Die verschiedenen serologischen Testverfahren (meist mit verschiedenen Antigenaufbereitungen) sind zum Teil in ihrer Spezifität bzw. in ihrer Sensitivität eingeschränkt. Im Einzelfall können sie jedoch wichtige Hinweise geben. Titerverlaufskontrollen ergeben für die Einschätzung des Infektionsgeschehens die wertvollsten Hinweise. Bei immunsupprimierten Patienten ist der Nachweis von Antigen bedeutsam.

Mit dem *Aspergillus fumigatus* HA-Antigen werden Antikörper gegen die Zellwandantigene von **Aspergillus fumigatus**, **Aspergillus flavus** und **Aspergillus nidulans** erfasst. Falsch positive Titer durch *Candida*-Antikörper sind nicht beobachtet worden.

Der *Aspergillus*-HA-Test wird früher positiv als die Präzipitationsreaktion mit metabolischen Antigenen. Er eignet sich deshalb besonders zur Früherfassung von Aspergillosen und damit auch zur Überwachung mykosegefährdeter Patienten.

Literatur

- 1) Biguet, J., Tran Van Ky, P, Andrieu, S., Fruit, J. 1964. Analyse immunoélectrophorétique d'extraits cellulaires et de milieux de culture d'*Aspergillus fumigatus* par des immunosérums expérimentaux et des sérums de malades atteints d'aspergillomebronchopulmonaire. Ann. Inst. Pasteur 107: 72 – 97
- 2) Hantschke, D. Diagnostischer Wert des *Aspergillus*-Hämagglutinations-Tests. Vortrag, Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Erlangen 1981
- 3) Polak, A., Müller, H. L. *Aspergillus*-Hämagglutinationstest mit Polysaccharidantigenen. Vortrag, Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Erlangen 1981
- 4) Seeliger, H. P. R., Sühler, H. 1974. Serologie der Aspergillose, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskrank., Hyg., Abt. 1, Orig. 229: 524 – 553
- 5) Fegeler, W. 1994. Aspekte zur Diagnostik tieflokalisierter, opportunistischer Mykosen. Mycoses 37 (Suppl. 2): 18 – 19

Kurzanleitung

50 µl Patienten- und Kontrollserum mit 550 µl 20 %ige Schaferythrozyten verdünnen und gut mischen



Inkubation 30 Minuten bei 50 °C



10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugieren



Überstand (= 1:10) durch Übertitrieren weiterverdünnen zu 1:20, 1:40 bis 1:1280



zu allen Verdünnungen 50 µl Antigensuspension geben, schütteln



dann Inkubation 2 Stunden bei 37 °C → erste Beurteilung



zweite Inkubation über Nacht bei 2 – 8 °C



zweite Beurteilung am nächsten Tag