



Gebrauchsinformation für *Candida albicans*-IHT

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

Diagnostische Bedeutung

Die mykologische Serodiagnostik ist ein wichtiger ergänzender diagnostischer Hinweis auf eine Pilzinfektion. Der alleinige Einsatz serologischer Methoden zur Erkennung einer Candidose 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. Serologische Testverfahren können jedoch wichtige Hinweise geben. Titerverlaufskontrollen ergeben für die Einschätzung des Infektionsgeschehens die wertvollsten Hinweise. Bei der Bewertung der Antikörpertiter spielen deshalb die Titerhöhe und vor allem der Titerverlauf eine besondere Rolle.

Durch die hohe Empfindlichkeit eignet sich der *Candida*-IHT zur Überwachung mykosegefährdeter Patienten und zur Früherfassung anlaufender Mykosen.

Testprinzip

Das Antigen für den indirekten Hämagglutinationstest zum Nachweis von Antikörpern gegen *Candida*-Arten wird nach einem Spezialverfahren aus *Candida albicans*, Serotyp A, gewonnen. Es handelt sich bei diesem Antigen um Polysaccharide mit mehreren serologisch aktiven Komponenten. Sie erfassen Antikörper, die gegen die Zellwand-Antigene der Sprosspilze gerichtet sind. Beim indirekten Hämagglutinationstest werden mit *Candida*-Antigen beladene, formalinisierte Schaferythrozyten verwendet. Sie reagieren mit spezifischen Serumantikörpern und bilden sichtbare flächige Agglutinate. Der Test erfasst hauptsächlich Antikörper der Klasse IgM; IgG werden nur 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 Candida-Antigen beladene formalinisierte Schafererythrozyten, 5 x 8 ml, lyophilisiert.

Zusätzlich erforderliches Material

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

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

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

Aqua dest.

Physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl)

Mikrotestplatten mit Spitzboden

Mikropipetten mit Einmalspitzen

Röhrchen zur Probenverdünnung

Wasserbad

Vorbereitung, Lagerung und Stabilität der Reagenzien

a) Mit Candida-Antigen beladene, formalinisierte Schafererythrozyten, 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 gefroren, 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 Erythrozyten-Suspension.

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-suspension 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 **Candida-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. Ein Hämagglutinationstiter im Serum von 1:160 gilt bei Erwachsenen im Allgemeinen als normal. Ist die immunologische Abwehr des Patienten durch das Grundleiden oder durch Medikamente geschwächt, so können auch Titer innerhalb des Normalbereiches Bedeutung haben.

Aus einer einmaligen serologischen Untersuchung sind keine diagnostischen Rückschlüsse erlaubt. Als signifikant gelten Titerbewegungen von mindestens 3 Stufen. Im Liquor kommen normalerweise keine Candida-Antikörper vor. Ein Titer von 1:4 gilt bereits als pathologisch.

Aufgrund seiner guten Sensibilität ist der Candida IHT der Test der Wahl als Suchtest und in der Verlaufskontrolle.

Empfehlenswert sind bei Mykoseverdacht Untersuchungen im Abstand von 3 – 5 Tagen; bei Überwachung von mykosegefährdeten Patienten Untersuchungen im Abstand von 1 – 2 Wochen. Titer über 1:320 sind eindeutig pathologisch.

Leistungsbewertung des Candida-IHT

Der alleinige Einsatz serologischer Methoden zur Erkennung einer Candidose 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 (i. d. R. mit verschiedenen Antigenaufbereitungen) sind zum Teil in ihrer Spezifität bzw. in ihrer Sensitivität eingeschränkt. Der Candida albicans-IHT kann jedoch wichtige Hinweise geben. Titerverlaufskontrollen ergeben für die Einschätzung des Infektionsgeschehens die wertvollsten Hinweise. Aufgrund seiner Sensibilität ist der Candida-IHT als Suchtest besonders geeignet.

Mit dem Candida-IHT werden Antikörper gegen **Candida albicans**, **Candida tropicalis**, **Candida parapsilosis** und **Torulopsis glabrata** erfasst. Kreuzreaktionen mit anderen fakultativ pathogenen Sprosspilzen kommen vor, doch sind dann niedrigere Titer zu erwarten.

Falsch positive Candida-Hämagglutinationstiter bei Tuberculose sind mit dem Candida-IHT-Test ausgeschlossen. Eine Differenzierung zwischen Schleimhaut- und Organmykosen ist nicht möglich.

Literatur

- 1) Biguet, J., Tran Van Ky, PI, Andrieu, S. and FJ. Fruit. 1965. Analyse immunélectrophorétique des antigènes fongiques et systématique des champignons. Répercussions pratiques sur le diagnostic des mycoses. Mycopath. mycol. Appl. 26: 241 – 256
- 2) Müller, H. L., Kranenberg, K. 1968. Untersuchungen über Antigengemeinschaften zwischen hefeartigen Pilzen. Mycopath. mycol. Appl. 35: 57 – 67
- 3) Müller, H. L., 1972. Die Serologie der Candida-Infektionen. Klin. Wschr. 50: 809 – 818
- 4) Müller, H. L. 1973. Eine Studie der Spezifität des Candida-Hämagglutinations-Tests bei Patienten mit Lungentuberculose. Microbiol. Immunol. 158: 309 – 315
- 5) Müller, H. L. 1976. Serologische Diagnostik der Mykosen. Chemotherapy 22: 87 – 102
- 6) Drouhet, E. 1973. Electroxynerèse (immunoélectrodiffusion) en agarose, méthode rapide et sensible pour le diagnose des candidoses septicémiques et viscérales. Résultats comparatifs avec d'autres techniques d'immunodiffusion et d'immunofluorescence. Bull. Soc. franç. Mycol. Méd. 2: 11 – 14
- 7) 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 Schafererythrozyten 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



Inkubation 2 Stunden bei 37 °C → erste Beurteilung



zweite Inkubation über Nacht bei 2 – 8 °C



zweite Beurteilung am nächsten Tag