



Gebrauchsinformation für FLUORIMMUN-Influenza

Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) für Influenza A oder B

Best.-Nr.: FI-100, FI-200, FI-110, FI-120

Ausgabe: 2003-11

Diagnostische Bedeutung

Ein "grippaler Infekt" kann durch eine Vielzahl viraler, z. T. auch bakterieller Erreger hervorgerufen werden. Es treten dabei zumeist Krankheitssymptome der oberen Luftwege sowie Fieber und Gliederschmerzen auf. Die Zeichen einer echten Grippe dagegen beginnen überwiegend systemisch, mit plötzlich auftretendem allgemeinem Krankheitsgefühl, Kopfschmerzen, Myalgien, Schüttelfrost, Husten und hohem Fieber. Dabei können Pneumonien auftreten, die entweder durch Influenza A- oder Influenza B-Viren oder durch bakterielle Superinfektionen ausgelöst werden.

Mit diesem Test können frische oder kürzlich zurückliegende Influenza-Infektionen durch Unterscheidung der Virus-spezifischen Immunglobulinklassen erkannt werden. Dadurch können auch niedrige KBR-Titer interpretiert werden (1,3,4). Störfaktoren wie z.B. hämolytische Seren, antikomplementäre Serumaktivität oder unspezifische Serum-inhibitoren beeinflussen den Test nicht. Epidemiologisch kann der Nachweis von Influenza A-Virus-Subtypen bedeutungsvoll sein (2).

Testprinzip

Indirekter Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis von Typ-, Subtyp- und Immunglobulinklassen-spezifischen Influenzavirus-Antikörpern im Serum. Grundlage des Tests ist die Bindung Influenzavirus-spezifischer Antikörper an mit Influenzavirus-Antigen beschichtete Hühner-Erythrozyten auf Objektträgern. Der Bindungsnachweis erfolgt durch FITC-markierte Anti-human-IgA- bzw. Anti-human-IgG-Antikörper. Bei den Antigenen handelt es sich um die von der WHO für die jeweilige Saison empfohlenen Influenzavirus-Impfstämme.

Gefahrenhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die Laborvorschriften für die Handhabung von infektiösem Material!

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

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 72 Bestimmungen und enthält folgende Komponenten:

Reagenz	Best.-Nr.
6 Objektträger mit je 12 Auftragsfeldern. Auf jedem Auftragsfeld befindet sich ein Gemisch aus mit Influenzavirus-Antigen beschichteten Erythrozyten und unbeschichteten Kontroll-Erythrozyten: jeweils 20 % zu 80 % beim Nachweis von Influenza A (A/H1N1) Influenza A (A/H3N2 Influenza B und 40 % zu 60 % beim Nachweis von Influenza A (A/H1N1 + A/H3N2)	FI-511 FI-512 FI-520 FI-510
positives Kontrollserum 0,2 ml, 1:10 vorverdünnt, enthält 0,01 % Merthiolat; gebrauchsfertig Titerangabe siehe "Titerblatt"	FI-004
negatives Kontrollserum 0,2 ml, enthält 0,01 % Merthiolat, gebrauchsfertig	FI-006
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
Phosphat-Puffer-Konzentrat 20fach, 3 Flaschen mit je 7 ml (für je 140 ml Puffer)	P-040
Einbettungsmedium Flasche mit 1,5 ml, gebrauchsfertig	FI-007

FITC-markiertes Anti-human-IgM-Konjugat (Best.-Nr. FI-003) steht auf besondere Anforderung zur Verfügung. Nachweis von IgM-Antikörpern sollte nur nach vorheriger Entfernung eventuell vorhandener Rheumafaktoren im Serum erfolgen.

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.

Vorbereitung der Reagenzien

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

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

Testdurchführung zum Nachweis von IgA-Antikörpern

1. Patientenserum 1:150 in PBS verdünnen = Screeningverdünnung
(z. B. 5 µl Serumprobe + 745 µl PBS-Puffer)
2. Positives Kontrollserum (liegt 1:10 vorverdünnt vor) entsprechend den Angaben auf dem beiliegenden Datenblatt in PBS verdünnen.
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 Magnetrührer (800 Upm) in PBS inkubieren. Danach in einem zweiten Färbewännchen mit Aqua dem. 1 min auf Magnetrührer (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. 10 µl Anti-human-IgA-Konjugat pro Feld pipettieren.
8. 60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
9. Waschen und trocknen wie oben beschrieben.
10. Einbetten mit Einbettungsmedium, Deckglas auflegen.

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

Testdurchführung zum Nachweis von IgG-Antikörpern

1. Patientenserum in PBS verdünnen = Screeningverdünnungen
1:2500 bei Influenza A (bei Verdacht auf akute Infektion)
1:5000 bei Influenza B (bei Verdacht auf akute Infektion)
2. Positives Kontrollserum (liegt **1:10** vorverdünnt vor) entsprechend den Angaben auf dem beiliegenden Datenblatt in PBS verdünnen.
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 wie oben beschrieben (siehe Seite 3, Punkt 6).
7. 10 µl Anti-human-IgG-Konjugat pro Feld pipettieren.
8. 60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
9. Waschen und trocknen wie oben beschrieben.
10. Einbetten mit Einbettungsmedium, Deckglas auflegen.

Ablesen der Ergebnisse wie oben beschrieben.

Interpretation der Ergebnisse

Die Fluoreszenzintensität ist beim IgA-Nachweis meist schwächer als beim IgG-Nachweis. Der Nachweis von IgA-Antikörpern (Titer 1: \geq 150) spricht für eine akute oder kürzlich zurückliegende Infektion, jedoch können sie nicht bei jeder frischen Infektion bzw. nicht bei jedem Patienten nachgewiesen werden. Bei einem negativen IgA-Antikörpernachweis kann auch ein hoher IgG-Antikörpertiter auf eine frische oder kürzlich stattgefundene Infektion hindeuten: Antikörpertiter, die für eine akute oder kürzliche Infektion sprechen:

Influenza A **IgG = 1: \geq 2500** und / oder **IgA = 1: \geq 150**

Influenza B **IgG = 1: \geq 5000** und / oder **IgA = 1: \geq 150**

Bei unklaren Ergebnissen sollten die Seren nochmals in einer Verdünnungsstufe unterhalb der Screeningverdünnung und der Screeningverdünnung wiederholt werden.

Z. B. Influenza A: IgG 1:1250 und 1:2500

Die angegebenen Titer dienen nur als allgemeine Richtlinie, da sie sich durch die ständig wechselnden Influenza-Stämme ändern können.

Nach Infektionsbeginn wird das Titermaximum 1 - 2 Wochen p. i. erwartet. IgA-Antikörper können bis zu 6 Monate p. i. mit einem Titer = 1:80 nachgewiesen werden, während IgG-Titer über einen Zeitraum vom mehr als einem Jahr auf hohem Niveau persistieren können.

Für die Influenza A-Virusdiagnostik kann auch eine Subtyp-spezifische Untersuchung angeschlossen werden:

FLUORIMMUN-Influenza A/H1N1 Best.-Nr. FI-110

FLUORIMMUN-Influenza A/H3N2 Best.-Nr. FI-120

Leistungsmerkmale des Tests

Nachweisempfindlichkeit

Die Grenztiter zur Erkennung einer frischen bzw. nur kurze Zeit zurückliegenden Infektion wurden mit Seren ermittelt, bei denen jeweils eine klinisch gesicherte Infektion vorlag (1). 62 Seren wurden auf IgG- und IgA-Antikörper gegen Influenza A getestet, 60 Seren auf Antikörper gegen Influenza B.

Influenza A	Antikörper	Grenztiter
	IgG	1:≥ 2500
	IgA	1:≥ 150

Influenza B	Antikörper	Grenztiter
	IgG	1:≥ 5000
	IgA	1:≥ 150

Spezifität und Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivitäten wurden Patientenseren mit klinisch gesicherter Infektion verwendet; 62 Seren wurden mit dem FLUORIMMUN Influenza A untersucht, 60 Seren mit dem FLUORIMMUN B.

Die Spezifitäten des FLUORIMMUN Influenza A und B wurden mit 103 Prä-Epidemieseren ermittelt.

Influenza A	Antikörper	Sensitivität	Spezifität
	IgG	83,8%	95,1%
	IgA	77,5%	99,0%

Influenza B	Antikörper	Sensitivität	Spezifität
	IgG	72,5%	100%
	IgA	85,3%	100%

Störfaktoren wie z.B. hämolytische Seren, antikomplementäre Serumaktivität oder unspezifische Serumhibitoren beeinflussen den Test nicht.

Stammspezifität

In einer Versuchsreihe wurden 30 Patientenseren aus einer Influenza A H3N2 – Epidemie mit dem FLUORIMMUN Influenza A untersucht. Alle Seren zeigten eine bevorzugte Antikörperantwort für den damals kursierenden Stamm (2).

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- bzw. IgG-Konjugate mindestens 1 Stunde vor Gebrauch lösen.

Das Kontrollserum ist bereits 1:10 vorverdünnt - dies muss bei der weiteren Verdünnung berücksichtigt werden.

Literatur

- 1) Döller G., Gerth H.-J., (1991) Evaluation of Single Serum Diagnosis after Influenza Infections. Lab. med. 15, 560-562
- 2) Döller G., Merk C., Gerth H.-J. (1988) Serologische Influenza-Diagnostik: Ist der Immunfluoreszenztest eine Alternative zum Hämagglutinationshemmtest beim stammspezifischen Antikörpernachweis? Lab. med. 12, 372-377
- 3) Döller G., Döller P. C., Gerth H.-J. (1986) Diagnostic significance of influenza subtype-specific IgG, IgA and IgM antibodies. J. Biol. Standard. 14, 163-175
- 4) Döller P. C., Döller G., Gerth H.-J. (1985) Immunofluorescence test with antigen-loaded erythrocytes: detection of influenza virus specific IgG, IgA and IgM antibodies. Med. Microbiol. Immunol. 173, 291-302