

Gebrauchsinformation zu Röteln-Antigen

Konzentrat, lyophilisiert, vorgesehen zur Anwendung im Röteln HAH/HHT
Best.-Nr.: RA-020 / RA-520
Ausgabe: 2003-11

Diagnostische Bedeutung

Rötelnvirusinfektionen verursachen meist eine harmlos verlaufende Kinderkrankheit, wobei es zu einer Krankheitshäufung bei Kindern zwischen dem dritten und zehnten Lebensjahr kommt. Aufgrund der Symptomatik lassen sich Rötelninfektionen oft nur schwer klinisch diagnostizieren, da etwa 30 - 40 % der Infektionen inapparent verlaufen (1).

Eine fetale Infektion während der Frühschwangerschaft kann jedoch zu schweren congenitalen Abnormitäten führen. Das Ausmaß der fetalen Schädigung ist von der teratogenen Potenz des Virus abhängig und vom Zeitpunkt der Infektion während der Schwangerschaft: im ersten Trimenon der Schwangerschaft beträgt das Risiko einer fetalen Schädigung 25 - 35 % und nimmt mit zunehmendem Schwangerschaftsverlauf ab (2, 3).

Antikörper gegen das Rötelnvirus sind schon kurz nach Auftreten der Symptome nachweisbar. Im Gegensatz zu spezifischen IgM-Antikörpern, die in der Regel nur in den ersten 8 Wochen nachweisbar sind, weisen spezifische IgG-Antikörper eine lebenslange Persistenz auf.

Auch nach erfolgreicher Impfung können Reinfektionen auftreten, die in der Regel asymptomatisch verlaufen und durch eine erhöhte Konzentration spezifischer IgG-Antikörper diagnostiziert werden können (4).

Der Nachweis einer bestimmten Konzentration spezifischer IgG-Antikörper im Serum läßt auf eine ausreichende Immunität gegenüber einer Rötelninfektion schließen.

Die Mutterschaftsrichtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen schreiben vor, dass die Immunität mit dem HAH-Test zu bestimmen ist: „...ein positiver Antikörpernachweis gilt ohne zusätzliche Untersuchungen als erbracht, wenn der HAH-Titer mindestens 1: 32 beträgt...“

Testprinzip

Das Röteln-Antigen wird im Hämagglutinations-Hemmtest eingesetzt. Dieser Test weist Antikörper der Klasse IgG und IgM nach.

Grundlage des Tests ist die Fähigkeit des Röteln-Antigens, Küken-Erythrozyten zu agglutinieren = Hämagglutination. Durch spezifische Röteln-Antikörper im Patientenserum wird diese Agglutination gehemmt = Hämagglutinations-Hemmung (HAH / HHT). Unspezifische Hemmfaktoren im Serum müssen durch ein Adsorptionsverfahren entfernt werden.

Gefahrenhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die Laborvorschriften für die Handhabung von infektiösem Material!

Das Röteln-HA-Antigen 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.

Inhalt der Testpackung

Röteln-Antigen (Antigentiter siehe Etikett)	Lyophilisat für 1 ml Lyophilisat für 5 ml	Best.-Nr. RA-020 Best.-Nr. RA-520
--	--	--------------------------------------

Zusätzlich erforderliche Reagenzien

Reagenz	Menge	Best.-Nr.
Röteln-Kontrollseren Röteln-IgG-hochpositiv, -niedrigpositiv, -negativ	3 x je 0,1 ml 3 x je 1,0 ml	RS-030 RS-130
DGV-Albumin-Puffer DGV-Puffer mit 0,2 % Albumin, gebrauchsfertig	50 ml	P-020
Adsorptionspuffer DGV-Puffer mit Manganchlorid und Heparin, gebrauchsfertig	7 ml 50 ml	P-030 P-031
Adsorptions-Erythrozyten 10 %ige Küken-Erythrozyten-Suspension in DGV-Puffer, aus frisch gewonnenem keimfreien Küken-Vollblut, gebrauchsfertig	7 ml 20 ml 50 ml	E-011 E-021 E-051
Test-Erythrozyten 0,25 %ige Küken-Erythrozyten-Suspension in DGV-Puffer, aus frisch gewonnenem keimfreien Küken-Vollblut, fotometrisch eingestellt, gebrauchsfertig	7 ml 20 ml 50 ml	E-012 E-022 E-013

Zusätzlich erforderliches Material

Mikrotiterplatten mit V- oder U-Form
Schüttelgerät für Mikrotiterplatten
Brutschrank mit 37 °C
Mikropipetten mit Einmalspitzen

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

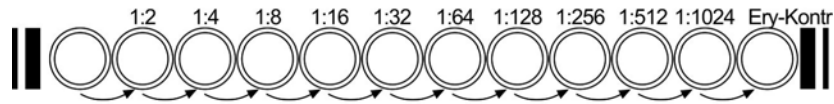
Reagenzien bis zur Anwendung bei + 2 °C bis + 8 °C aufbewahren. Haltbar bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Datum.

Rekonstituiertes Rötelnantigenkonzentrat kann 14 Tage bei + 2 °C bis + 8 °C gelagert werden. Es empfiehlt sich jedoch nicht verbrauchtes Antigen aliquotiert bei -20 °C zu lagern. Bei -20 °C beträgt die Laufzeit 12 Monate. Antigen nicht wiederholt auftauen und einfrieren.

Vorbereitung der Reagenzien

Lyophilisiertes Antigen mit 1 ml bzw. 5 ml Aqua dem. rekonstituieren.
Der auf dem Etikett angegebene Hämagglutinationstiter sollte vor Verwendung beim Verbraucher nochmals ermittelt werden.

Ermittlung des Antigentiters und Einstellung der Gebrauchsverdünnung



Auf einer Mikrotiterplatte mindestens 3 Reihen ansetzen:

- In die Vertiefungen 2 bis 12 je 25 µl DGV-Albumin-Puffer vorlegen.
- In die Vertiefungen Nr. 1 jeder Reihe je 50 µl Antigen geben und 25 µl übertitrieren.
- In alle Vertiefungen je 25 µl DGV-Albumin-Puffer.
- In jede Vertiefung je 25 µl 0,25 % Küken-Erythrozyten-Suspension geben.
- Mikrotiterplatte vorsichtig 1 min schütteln.
- Ca. 1 Stunde bei + 4 °C stehenlassen.

Als Titer gilt die Verdünnung mit der letzten deutlich sichtbaren Hämagglutination. Für den HAH wird ein Antigen mit einer Konzentration von 4 – 8 hämagglutinierenden Einheiten (HAH-Einheiten) benötigt.

Beispiel: Antigentiter = 1:512

$$\frac{\text{Antigen-Titer}}{\text{Gewünschte HA-Einheiten}} = \frac{512}{8} = 64$$

Um 8 HA-Einheiten zu erhalten, muss also das Antigen 1:64 verdünnt werden.

Probenmaterial

Hämolytische, lipämische, oder mikrobiell kontaminierte Seren sind für den Test nicht geeignet.

Testdurchführung

Der Test wird auf Mikrotiter-Platten mit V- oder U-Form bei + 2 °C bis + 8 °C im Kühlschrank durchgeführt. Bei jedem Test-Ansatz müssen Kontroll-Seren (z. B. Best.-Nr. RS-030) mitgeführt werden.

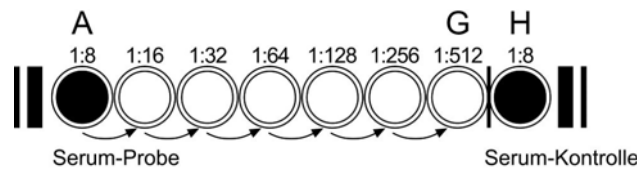
1. Serum-Vorbehandlung (Proben + Kontrollseren)

- 50 µl (100 µl) Serumprobe + 125 µl (250 µl) Adsorptionspuffer, mischen.
- 15 min bei + 4 °C bis + 8 °C inkubieren.
- + 250 µl (500 µl) Adsorptions-Erythrozyten, mischen.
- 30 – 60 min bei + 4 °C bis + 8 °C inkubieren, dabei mehrmals schütteln.
- 10 min bei 1000 g oder 1 min bei 8000 g zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abnehmen. Der in einer Serumverdünnung von 1:8 vorliegende Überstand wird im Test eingesetzt.

2. Serum-Titration und Serum-Kontrolle



- In die Vertiefungen B bis H der Mikrotiterplatte je 25 µl DGV-Albumin-Puffer vorlegen.
- In die Vertiefung A 50 µl und in die Vertiefung H 25 µl der Serumverdünnung 1:8 einfüllen.



Serum-Titration von 1:8 nach 1:512 (Mikrotiter-Platte A bis G):

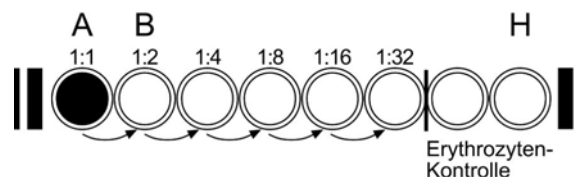
- Aus erster Vertiefung 25 µl in die zweite Kavität übertragen, mischen und weiterübertragen.
- Aus der letzten Vertiefung der Serumtitration (1:512) werden nach dem Mischen 25 µl entnommen und verworfen.



- In Kavität A bis G je 25 µl verdünntes Röteln-Antigenkonzentrat pipettieren

3. Röteln-Antigen- und Erythrozyten-Kontrolle

Auf einer Mikrotiter-Platte eine Antigen- und Erythrozyten-Kontrolle ansetzen:



- In die Vertiefungen B bis H je 25 µl DGV- Albumin-Puffer vorlegen.
- In die erste Vertiefung 50 µl verdünntes Röteln-Antigenkonzentrat geben und eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:32 herstellen:
- 25 µl von der ersten in die zweite Kavität übertitrieren, mischen, usw.
- Aus 1:32 nach dem Mischen 25 µl entnehmen und werfen.
- Vertiefungen der Erythrozyten-Kontrolle bleiben ohne Röteln-Antigen.
- In alle Vertiefungen der Röteln-Antigen-und Erythrozyten-Kontrolle je 25 µl DGV-Albumin-Puffer einfüllen.

4. Erste Inkubation

- Alle Mikrotiter-Platten vorsichtig 1 min schütteln (Schüttelgerät)
- Zugedeckt 20 min bei + 37 °C ohne Erschütterung inkubieren

5. Test-Erythrozyten-Zugabe

- Test-Erythrozyten sorgfältig suspendieren, so dass keine Klümpchen mehr zu sehen sind.
- In sämtliche Vertiefungen aller Mikrotiterplatten je 25 µl Test-Erythrozyten einfüllen.
- Die Mikrotiterplatten vorsichtig 1 min schütteln (Schüttelgerät).

6. Zweite Inkubation

- Zugedeckt 1 Stunde bei + 2 °C bis + 8 °C ohne Erschütterung stehen lassen.

Testauswertung

Gültigkeitskriterien

Eine Ablesung ist nach 1 Stunde möglich. Voraussetzung ist, dass die Kontrollen, besonders Erythrozyten- und Antigen-Kontrolle eindeutig ablesbar sind:

Erythrozyten-Kontrolle	Die Erythrozyten-Kontrollen müssen eine negative Reaktion = scharfer roter Erythrozyten-Knopf zeigen.
Serum-Kontrolle	Vorbehandeltes Serum 1:8 + Test-Erythrozyten muss eine negative Reaktion = scharfer roter Erythrozyten-Knopf zeigen.
Röteln-Antigen-Kontrolle	Die ersten 2 Vertiefungen (Antigen-Verdünnung 1:1 und 1:2) sollen eine vollständige, danach eine abgestufte Hämagglutination aufweisen.

Zur Kontrolle und bei zweifelhaften Reaktionen kann nochmals nach spätestens 12 Stunden abgelesen werden. Platten in der Zwischenzeit im Kühlschrank erschütterungsfrei aufbewahren. Mitgeführte Kontroll-Seren dürfen in ihrem Titer höchstens um ± 1 Titerstufe vom angegebenen Wert abweichen.

Beurteilung der Test-Ergebnisse

Der Antikörpertiter ist die höchste Serum-Verdünnung, die noch einen scharfen roten Knopf = deutliche Hemmung der Hämagglutination zeigt.

Sollten einzelne Proben nicht sicher abgelesen werden können, d. h. die Titrierung nach oben oder unten ist nicht erreicht oder die Serum-Kontrolle zeigt ein unklares Ergebnis, so reicht der restliche Überstand aus der Serum-Vorbehandlung für eine Wiederholung aus.

In diesem Fall kann bei Benützung der Mikrotiterplatte von Reihe 1 bis 12 die Titrierung von 1:8 bis 1:1024 mit Serumkontrolle von 1:8 nach 1:16 gewählt werden. In die ersten Vertiefungen von Serum-Titration und Serum-Kontrolle wird dann kein DGV-Albumin-Puffer und nur 50 µl Überstand der vorbehandelten Seren (Verdünnung 1:8) gegeben und weitertitriert. Die übrigen Schritte erfolgen wie bei Punkt 3 beschrieben.

Interpretation der Ergebnisse

Bei Hinweis auf eine mögliche frische Röteln-Infektion durch die klinische Anamnese ist zu beachten:

Der HAH/HHT weist IgG und IgM Antikörper nach, eine Unterscheidung ist nicht möglich, deshalb kann jeder Titer auch IgM-positiv sein.

Für den Immunstatus bei negativen IgM-Titer gilt:

HAH-Titer	Interpretation	weiteres Vorgehen
≥ 1:32 IgM negativ	Immunität anzunehmen.	Keine Maßnahmen.
1:8 – 1:16 IgM negativ	Schwacher Antikörpertiter.	Abklärung erforderlich mit anderen Testverfahren, z. B. ELIMMUN-Rubella G oder Hämolyse-Gel-Test (HiG).
Negativ IgM negativ	Keine Antikörper nachweisbar.	Impfung erforderlich.

Spezifität und Sensitivität

Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität wurden laborintern durchgeführt, zusätzlich liegen Ergebnisse aus Ringversuchen der DVV, GfV, DGHM; INSTAND (Jahre 2000 – 2002) vor.

Mit 18 Referenzseren des Paul-Ehrlich-Institutes wurde im Vergleich mit anderen zugelassenen Röteln-Antigen-Methoden festgestellt:

Spezifität: 100,0 %
Sensitivität: 93,7 %
Vorhersagewert: 100,0 %

In den Ringversuchen wurden im HAH 12 Seren in insgesamt 260 Einzeluntersuchungen getestet.

6 Ergebnisse waren falsch, 254 = 97,7 % waren richtig.

Spezifität: 91,9 %
Sensitivität: 99,4 %
Vorhersagewert: 97,5 %

Literatur

- 1) Enders, G., (1986) Röteln, In: Klinische Virologie (Gsell O., Krech U., Mohr W. ed.) Urban & Schwarzenberg, München. S. 157 - 172
- 2) Bellanti, J. A., Artenstein MS, Olson LC, Buescher EL, Lubos CE, Milstead KC (1965) Congenital Rubella. Amer. J. Dis. Child. 110, S. 464 - 472
- 3) Enders, G., (1991) Diagnostik von Rötelninfektionen in der Schwangerschaft durch konventionelle, immunologische und molekular-biologische Methoden. In: Neues in der Virusdiagnostik (Deinhardt F., Mass G., Spiess H. ed.). Deutsches grünes Kreuz, München. S. 133 - 152
- 4) Enders, G., (1991) Röteln, In: Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft