

Gebrauchsinformation für Hämolyse-Gel-Test für Röteln (HiG)

Radial-Hämolyse in Gel (HiG)

Best.-Nr.: RH-100

Ausgabe: 2010-03

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.

Der Test wurde zur Immunstatusbestimmung nach Immunisierung oder Rötelninfektion und zur Bestätigung schwach positiver Ergebnisse im Hämagglutinationshemmtest (HHT / HAH) konzipiert.

Testprinzip

Der Hämolyse-Gel-Test weist Antikörper der Klasse IgG nach. Das Prinzip des Hämolyse-Gel-Tests für Röteln beruht auf der radialen Diffusion der zu testenden Serumantikörper in einer Gelschicht. In der Gelschicht sind Rötelnantigen-beschichtete Kükenerythrozyten enthalten. Enthält die Serumprobe Röteln-spezifische Antikörper, so lagern sich diese während der Diffusionszeit an die Rötelnantigen-beschichteten Kükenerythrozyten an. Durch Zugabe von Komplement werden diese Antikörper beladenen Erythrozyten lysiert, wodurch ein klarer Hof in der Gelschicht entsteht, dessen Durchmesser proportional zur Menge der Rötelnantikörper ist, die im Serum enthalten sind.

Gefahrenhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die Laborvorschriften für die Handhabung von infektiösem Material!

Das Rötelnantigen zur Beschichtung der Kükenerythrozyten 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

Der Inhalt einer Testpackung ist ausreichend für 13 Serum- oder Kapillarblutproben und enthält folgende Komponenten:

Testplatte

Agarose-Gel mit Röteln-Antigen-beschichteten Küken-Erythrozyten

Komplement

0,8 ml Meerschweinchen-Serum, lyophilisiert

DGV-Puffer

4,0 ml Dextrose-Gelatine-Veronal-Puffer

Zusätzlich erforderliches Material

Kontrollserum (Best.-Nr. RS-030 oder RS-130)

Brutschrank mit 37 °C

Wasserbad

Mikropipetten mit Einmalspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Lineal oder Schablone (auf Anfrage erhältlich)

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Hämolytische, kontaminierte Proben oder Seren, die Partikel enthalten, sind für den Test nicht geeignet.

Die Proben können bei + 2 °C bis + 8 °C bis zu 5 Tagen oder bei - 20 °C für längere Zeit gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

Die Testpackung bei + 2 °C bis + 8 °C dunkel lagern und bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum verwenden.

Durchführung des HiG

1. Je 25 µl Serumprobe, einschließlich Kontrollserum, 30 min bei 56 °C im Wasserbad inaktivieren.
Eine weitere Serum-Vorbehandlung ist nicht erforderlich.
2. Pro Stanzloch 5 µl Serum sorgfältig einfüllen.
Agarschicht nicht beschädigen. Gelegentliches Überlaufen, durch Luftblasen oder Kondenswasser bedingt, hat in der Regel keinen Einfluss auf den Hämolyse-Hof.
3. 16 - 18 Stunden bei 37 °C inkubieren. Dabei besonders darauf achten, dass die Agar-Platten exakt waagrecht stehen.
4. Lyophilisiertes Komplement mit beigegebenem DGV-Puffer auflösen und gleichmäßig über die Platte verteilen.
5. 3 Stunden bei 37 °C inkubieren. Dabei besonders darauf achten, dass die Agar-Platten exakt waagrecht stehen.
6. Komplement absaugen oder abgießen. Platte zum Trocknen ca. 1 Stunde mit geöffnetem Deckel bei Zimmertemperatur stehenlassen.

AbleSEN der Ergebnisse

Der Hämolyse-Durchmesser wird mittels Lineal oder Schablone (auf Anforderung erhältlich) im Gegenlicht abgelesen. Die Verwendung eines Ablese-Gerätes ist möglich, aber nicht erforderlich. Die spezifische Hämolyse kann bei verschiedenen Proben unterschiedlich stark, manchmal auch ringförmig ausgebildet sein. Es wird stets der äußerste Hämolyserand abgelesen. Bei unscharf begrenzten Höfen ist eine zweite Ablesung am nächsten Tag sinnvoll. Ovale Hämolyse-Höfe entstehen durch ungleichmäßiges Einfüllen der Probe. Zur Ablesung darf nur das kreisförmige Segment des Hofes herangezogen werden.

Fehlerbetrachtung

1. Keine Hämolyse – mögliche Ursachen
 - Kein Serum pipettiert
 - Falsche Temperatur bei der Serum- oder Komplementinkubation (Temperatur und Zeit)
 - Kein Komplement zugegeben oder zu stark verdünnt

2. Hämolysehof vor der Komplementzugabe – mögliche Ursachen
 - Serum wurde nicht ausreichend inaktiviert
 - Serum zeigt Interaktionen und muss über eine Kontrollplatte abgeklärt werden

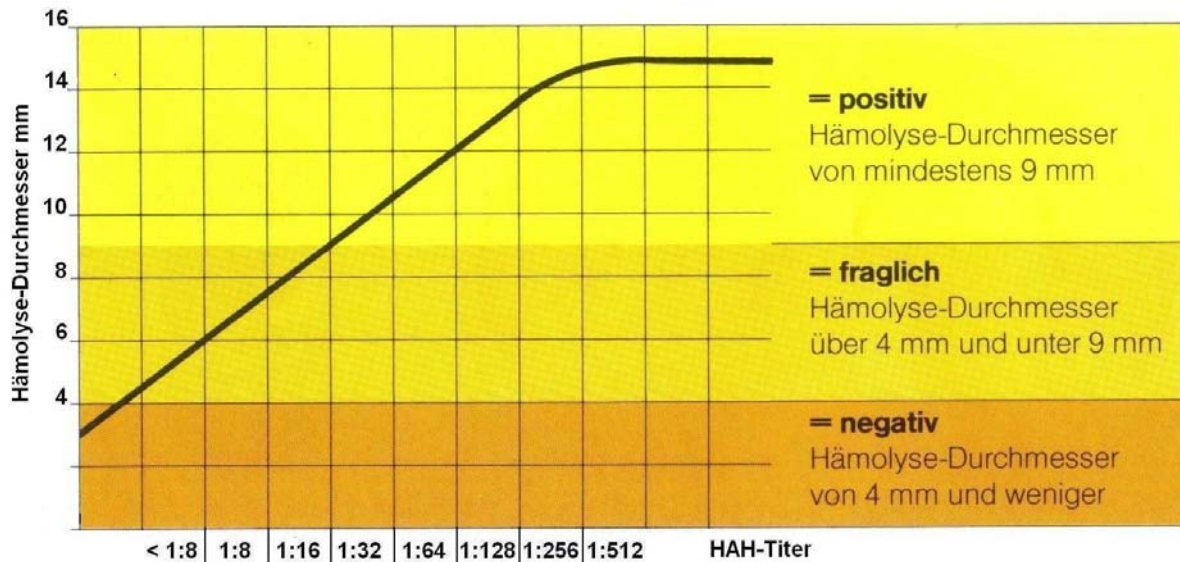
3. Zu große Hämolysehöfe – mögliche Ursachen
 - Zu viel Serum aufgetragen
 - Falsche Serum- oder Komplementinkubation (Temperatur und Zeit)
 - Komplement nicht richtig rekonstituiert

4. Keine kreisförmigen Hämolysehöfe – mögliche Ursachen
 - Kondenswasser in der Vertiefung
 - Keine waagrechte Seruminkubation
 - ungleichmäßiges Einfüllen der Probe

5. Testplatte hämolytisch – mögliche Ursachen
 - Falsche Lagertemperatur

Beurteilung der Ergebnisse

Die Größe der Hämolyse-Fläche bzw. des Hämolyse-Durchmessers steht in direktem Verhältnis zur Röteln-Antikörper-Konzentration des Serums. Ein Titervergleich zwischen Hämagglutinations-Hemmtest (HHT/HAH) und Hämolyse-Gel-Test (HiG) ist aus der Grafik ersichtlich.



Beim Vergleich zwischen Hämolyse-Durchmesser im HiG und HHT-Titer muss berücksichtigt werden, dass im HHT-Test - im Gegensatz zum Hämolyse-Gel-Test - geometrisch verdünnt wird. Dadurch kann der HiG-Titer zwischen zwei Verdünnungsstufen des HHT liegen, was dem tatsächlichen Antikörper-Gehalt des Serums entspricht. Im HHT werden beide Immunglobulinklassen, IgG- und IgM-Antikörper erfasst, während im HiG nur IgG-Antikörper nachgewiesen werden können. Die im HiG nachweisbaren IgG-Antikörper treten ab dem 5. Tag nach Infektionsbeginn auf. Eine Titerdifferenz zwischen HHT und HiG sollte deshalb stets nachgeprüft werden.

Ab einem Hämolysehof – Durchmesser von ca. 14,5 mm ist die Nachweisgrenze des HiG erreicht. Eine Differenzierung über $1:256$ ist deshalb nicht mehr möglich (siehe Plateaubereich im Diagramm).

Unspezifische Hämolyse-Reaktionen

1. Unspezifische Hämolyse-Reaktionen gegen Küken-Erythrozyten sind selten (im Gegensatz zu HiG mit Schaf-Erythrozyten). Es wird empfohlen, zur Abklärung solcher unspezifischer Hämolyse-Reaktionen jedes Serum zusätzlich mit der Kontroll-Testpackung (Agarose-Gel mit Küken-Erythrozyten ohne Röteln-Antigen, Best.-Nr. RH-110), zu untersuchen.
2. Stark trübe, kaum ablesbare Hämolyse-Höfe erscheinen, wenn das Serum IgG-Antikörper niedriger Avidität enthält, die bereits wenige Tage nach Infektionsbeginn auftreten (6, 7). Es wird empfohlen, solche Seren in einer anderen Testart und zusätzlich auf IgM-Antikörper zu untersuchen, da Verdacht auf eine akute Infektion besteht.
3. Selten zeigen sich innerhalb des Hämolyse-Hofes trübe, ringförmige Zonen, die durch unspezifische Serumbestandteile verursacht sind. Es sollte immer der äußerste Hämolyse-Rand abgelesen werden.

Interpretation der Ergebnisse

Bei der Interpretation muss unterschieden werden zwischen **Untersuchung auf Immunität** und **Verdacht auf akute Röteln-Infektion**.

Untersuchung auf Immunität

In den Mutterschafts-Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen wird definiert. "...Ein positiver Antikörpernachweis gilt ohne zusätzliche Untersuchungen als erbracht, wenn der HAH-Titer mindestens 1:32 beträgt. Bei niedrigeren HAH-Titern ist die Spezifität des Antikörper-Nachweises durch eine andere geeignete Methode zu sichern, für welche die benötigten Reagenzien staatlich zugelassen sind..."

Für den CE-markierten **Hämolyse-Gel-Test** gilt (siehe auch obige Grafik):

Hämolyse-Durchmesser	HHT-Titer	Antikörpernachweis
< 7 mm	< 1:8	negativ
8 mm	1:16	grenzwertig
9 mm	1:32	positiv

Grenzwertige Ergebnisse müssen durch eine Nachuntersuchung, entweder der gleichen Probe oder einer 2 - 4 Wochen später entnommenen Serumprobe, nachgeprüft werden.

Verdacht auf akute Röteln-Infektion

IgM-Antikörper, die ab dem 1. - 2. Tag nach Erkrankungsbeginn auftreten, lassen sich im HHT, nicht aber im HiG nachweisen. Bei frischen Infektionen können IgG-Antikörper im HiG ab dem 5. - 7. Tag, im HHT ab dem 2. Tag nach Krankheitsbeginn nachgewiesen werden. Ein Titer-Unterschied zwischen HAH / HHT-Titer und HiG-Durchmesser/Titer (HHT höher als HiG - siehe obige Grafik) deutet auf IgM-Antikörper = frische Infektion hin, ebenso im HiG stark trübe, kaum ablesbare Hämolyse-Höfe.

Ab dem 7. - 14. Tag nach Krankheitsbeginn laufen die IgG-Titer von HiG und HHT parallel. Bei Verdacht auf eine frische Röteln-Infektion während der Schwangerschaft sind weitere serologische Untersuchungen erforderlich, wie Nachweis Röteln-spezifischer IgM-Antikörper und / oder Kontrolle des Titerverlaufs.

Zur Standardisierung der Testergebnisse stehen staatlich zugelassene Kontroll-Seren (Best.-Nr. RS-030) zur Verfügung.

Leistungsmerkmale des Hämolyse-Gel-Test

Spezifität und Sensitivität

Ringversuche der DVV, GfV, DGHM; INSTAND (Jahre 2000 – 2002) wurden nach der Vier-Quadrat-Methode ausgewertet. Der HiG wurde in 315 Anwender-Labor-Prüfungen getestet. Von den 315 Ergebnissen waren 310 = 98 % richtig.

Spezifität: 97,1 %
Spezifität: 98,7 %
Vorhersagewert: 99,1 %

Im Vergleich mit einem vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassenen ELISA zum Nachweis von Röteln-IgG-Antikörpern ergab sich bei der Prüfung von 450 Proben:

Spezifität: 97,2 %
 Sensitivität: 98,0 %
 Vorhersagewert: 98,7 %

Präzision

Intraassay

Innerhalb einer Charge wurden drei Seren in jeweils 80 Einzelmessungen untersucht und die Durchmesser der Hämolysehöfe gemessen.

HAH-Titer der Seren	< 1:8	1:32	1:256
Mittelwert	< 5 mm	9,6 mm	14,6 mm
Standardabweichung	-	0,5 mm	0,5 mm
Variationskoeffizient	-	5,2 %	3,4 %

Interassay

In 29 verschiedenen Chargen wurden jeweils vier Seren (vier Kontrollseren und ein Röteln-positives Serum) untersucht und der Durchmesser der Hämolysehöfe gemessen. Das negative Kontrollserum ergab ausnahmslos negative Werte, d. h. die Durchmesser der Hämolysehöfe waren < 5 mm.

Serum	Neg.K-Serum	040/15	007/15	WM/07
Mittelwert	< 5 mm	10,2 mm	14,2 mm	11,5 mm
Standardabweichung	-	0,5 mm	0,5 mm	0,5 mm
Variationskoeffizient	-	4,9 %	3,5 %	4,4 %

Literatur

- 1) Enders G, (1986) Röteln, In: Klinische Virologie (Gsell O, Krech U, Mohr W, ed.) Urban & Schwarzenberg, München, 157 - 172
- 2) Bellanti J A, Artenstein MS, Olson LC, Buescher EL, Lubos CE, Milstead KC (1965) Congenital Rubella. Amer. J. Dis. Child. 110, 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, 133 - 152
- 4) Enders G, (1991) Röteln, In: Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft (Enders G, ed.) Urban & Schwarzenberg, München, 9 - 35
- 5) Hedman K, Salonen EM, Keski-Oja J, Rähä K, (1986) Single-serum radial hemolysis to detect recent rubella virus -infection. J. Inf. Dis. 154, 1018 - 1023
- 6) Hedman K, Seppälä I, (1988) Recent Rubella Virus Infection Indicated by a Low Avidity of Specific IgG. J. Clin. Imm. 8, 214 - 221
- 7) Zippel C, Federgamm G, Leidel J, Eggert HJ, (1980) Quantitativer Nachweis von Röteln-Virusantikörpern im Kapillarblut. Münch. med. Wschr. 122, 943 - 946