

## Gebrauchsinformation für RUBELLA-AGGLUTEST

Röteln-Hämagglutinations-Hemmtest (HHT bzw. HAH)

Best.-Nr.: RT-200

Ausgabe: 2009-06

### 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

Der Hämagglutinations-Hemmtest 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 und Zusammensetzung der Testpackung

Die Testpackung ist ausreichend für 100 Serum-Proben bei 7 Titerstufen (1:8 bis 1:512) und enthält folgende Komponenten:

Reagenz	Menge	Best.-Nr.
Agglutest-Puffer (Tris/NaCl/CaCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> -Puffer, pH 7,4), gebrauchsfertig	5 x 19 ml	RT-001
Kaolin-Suspension (25 %ig in Boratpuffer, pH 9,0) gebrauchsfertig	10 x 4 ml	RT-002
Röteln-Antigen Lyophilisat (4 - 8 HA-Einheiten)	5 x für 4,8 ml	RT-003
Vorbehandlungs-Erythrozyten Lyophilisat, (10 %ige Küken-Erythrozyten, konserviert)	5 x für 1,2 ml	RT-004
HA-Erythrozyten Lyophilisat (0,25 %ige Eintagsküken-Erythrozyten, konserviert)	5 x für 4,8 ml	RT-005

### Zusätzlich erforderliches Material

Mikrotiterplatten mit V-Form  
Schüttelgerät für Mikrotiterplatten  
Brutschrank mit 37 °C  
Mikropipetten mit Einmalspitzen  
Kontrollserum (z. B. Best.-Nr. RS-030)

### 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.  
Lyophilisierte Reagenzien sind nach Auflösung bei + 2 °C bis + 8 °C aufzubewahren und am gleichen Tag zu verwenden.

### Vorbereitung der Reagenzien

Lyophilisierte Reagenzien vor Gebrauch auflösen..

<b>Vorbehandlungs-Erythrozyten</b>	Lyophilisat mit 1,2 ml Agglutest-Puffer rekonstituieren
<b>Röteln-Antigen</b>	Lyophilisat mit 4,8 ml Agglutest-Puffer rekonstituieren
<b>HA-Erythrozyten</b>	Lyophilisat mit 4,8 ml Agglutest-Puffer rekonstituieren

### Probenmaterial

Im RUBELLA-Agglutest wird Serum getestet. Hämolytische, lipämische oder mikrobiell kontaminierte Seren 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.

## Testdurchführung

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

### 1. Serum-Vorbehandlung

Kaolin-Suspension kräftig schütteln.

- 50 µl (100 µl) Serum-Probe + 150 µl (300 µl) Kaolin-Suspension, mischen.
- 20 min bei Raumtemperatur einwirken lassen.
- 10 min bei 1.000 g oder 1 min bei 8.000 g zentrifugieren.
- 150 µl Überstand gewinnen, Rest verwerfen. Kein Kaolin mit aufsaugen!
- Aufgelöste Vorbehandlungs-Erythrozyten durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen gut suspendieren.
- 50 µl Vorbehandlungs-Erythrozyten zu dem gewonnenen Überstand (150 µl) geben, mischen.
- 20 min bei Raumtemperatur einwirken lassen.
- 10 min bei 1.000 g oder 1 min bei 8.000 g zentrifugieren.
- Überstand sofort abnehmen, nicht auf dem Erypellet stehen lassen.
- Der in einer Serum-Verdünnung von 1:4 vorliegende Überstand wird im Test eingesetzt.

### 2. Testansatz

Der Test wird auf Mikrotiter-Platten mit V-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. Für die Gültigkeitskriterien des Tests werden zusätzlich eine Serum-Kontrolle (2.1.), eine Erythrozytenkontrolle (2.2) und eine Röteln-Antigen-Kontrolle (2.2) angesetzt.

**Siehe Kurzanweisung Seite 7**

#### 2.1 Serum-Titration und Serum-Kontrolle

- In die Vertiefungen A bis H der Mikrotiterplatte je 25 µl Agglutest-Puffer vorlegen.
- In die Vertiefung A und H je 25 µl der Serumverdünnung 1:4 einfüllen.

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

- Die Vertiefung A mischen und 25 µl in Vertiefung B übertragen, mischen und weiter übertragen.
- Aus der letzten Vertiefung G der Serumtitration (1:512) werden nach dem Mischen 25 µl entnommen und verworfen.
- Die Vertiefung H der Serum-Kontrolle mischen, 25 µl entnehmen und verwerfen.
- In Kavität A bis G je 25 µl Röteln-Antigen pipettieren.
- In die Vertiefung H der Serumkontrolle 25 µl Agglutest-Puffer einfüllen.

## 2.2. Röteln-Antigen- und Erythrozyten-Kontrolle

In die Vertiefungen B bis H je 25 µl Agglutest-Puffer vorlegen.

- In die Vertiefung A 50 µl Röteln-Antigen geben, mischen.
- 25 µl von der Vertiefung A in die Vertiefung B übertitrieren, mischen, usw.
- Aus der Vertiefung F 1:32 nach dem Mischen 25 µl entnehmen und verwerfen.
- Vertiefungen G und H der Erythrozyten-Kontrolle bleiben ohne Röteln-Antigen.
- In alle Vertiefungen der Röteln-Antigen- und Erythrozyten-Kontrolle je 25 µl Agglutest-Puffer einfüllen.

## 3. Erste Inkubation

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

## 4. HA-Erythrozyten-Zugabe

- Aufgelöste HA-Erythrozyten müssen vollständig suspendiert sein, so dass keine Klümpchen mehr zu sehen sind. Ansonsten durch vorsichtiges Aufziehen und Ausstoßen vollständig suspendieren.
- In sämtliche Vertiefungen aller Mikrotiter-Platten 25 µl HA-Erythrozyten einfüllen.
- Die Mikrotiter-Platten vorsichtig 1 min schütteln (Schüttelgerät).

## 5. Zweite Inkubation

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

## 6. Ablesen der Ergebnisse

Das Testergebnis kann abgelesen werden, sobald die Kontrollen eindeutig die erwartete Reaktion zeigen (siehe Testgültigkeitskriterien) – in der Regel nach 50 bis 60 min Inkubationszeit. Falls die Erythrozyten dann noch nicht klar als Knopf abgesetzt haben, sollte der Test noch 5 – 10 min bei Raumtemperatur nachinkubiert werden.

### Testauswertung

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

<b>Erythrozyten-Kontrolle</b>	Die Erythrozyten-Kontrollen müssen eine negative Reaktion = scharfer rotbrauner Erythrozyten-Knopf zeigen.
<b>Serum-Kontrolle</b>	Vorbehandeltes Serum 1:8 + Test-Erythrozyten muss eine negative Reaktion = scharfer rotbrauner Erythrozyten-Knopf zeigen.
<b>Röteln-Antigen-Kontrolle</b>	Die Vertiefungen A und B (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 müssen im angegebenen Titerbereich liegen.

### **Fehlerbetrachtung**

#### 1. Knopfbildung in allen Vertiefungen - mögliche Ursachen

- Kein Antigen pipettiert
- Falsche Temperatur bei Antigeninkubation oder HA-Erythrozyteninkubation
- Ungenügende Durchmischung nach Zugabe von Antigen oder HA-Erythrozyten
- Hämolytische Test-Erythrozyten (rötlich gefärbter Überstand der Erythrozytenlösung)

#### 2. Agglutination in allen Vertiefungen - mögliche Ursachen

- Testpuffer verunreinigt (Flöckchen oder Trübung)
- HA-Erythrozyten oder Adsorptions-Erythrozyten waren hämolytisch (rötlich gefärbter Überstand der Erythrozytenlösung)
- Falsche Temperatur bei Antigeninkubation oder HA-Erythrozyteninkubation
- Serum-Kontrolle des Patienten war nicht einwandfrei (volle oder teilweise Agglutination)
- Patientenserum von Schwangeren aus früher Schwangerschaftsphase (neigt zu gestörter Serum-Kontrolle)
- Polyklonale Antikörperstimulierung möglich

### **Beurteilung der Test-Ergebnisse**

Der Antikörpertiter ist die höchste Serum-Verdünnung, die noch einen scharfen rotbraunen 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 Benutzung der Mikrotiterplatte von Reihe 1 bis 12 die Titrierung von 1:4 bis 1:2048 mit Serum-Kontrolle von 1:4 nach 1:8 gewählt werden. In die ersten Vertiefungen von Serum-Titration und Serum-Kontrolle wird dann kein Agglutest-Puffer und nur 50 µl Überstand der vorbehandelten Seren (Verdünnung 1:4) gegeben.

### **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.  Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass auf Grund der erlaubten Titerschwankung von ± 1 Titerstufe bei einem gemessenen Titer von 1:32 die Möglichkeit besteht, dass dieses Serum auch einen Titer von 1:16 haben kann. Wir empfehlen deshalb die Nachuntersuchung von Seren mit einem Titer von 1:32 in einer zweiten Methode wie z. B. Hämolyse-Gel-Test oder ELIMMUN-Rubella G.

1:8 – 1:16 IgM negativ	Schwacher Antikörpertiter.	Abklärung erforderlich mit anderen Testverfahren, z. B. ELIMMUN-Rubella G, Hämolyse-Gel-Test (HiG) oder FLUORIMMUN-Rubella
Negativ IgM negativ	Keine Antikörper nachweisbar.	Impfung erforderlich.

## Leistungsmerkmale des Tests

### Nachweis-Empfindlichkeit

Die Nachweisempfindlichkeit wurde mit einem Röteln-Referenzserum des Paul-Ehrlich-Institutes geprüft. Das Serum mit 265 iE/ml ergab einen Titer von 1:256

### Spezifität und Sensitivität

Im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen ELISA ergab sich bei der Prüfung von 582 Proben:

Spezifität: 99,3 %  
Sensitivität: 94,5 %  
Vorhersagewert: 99,6 %

### Präzision

Fünf Seren wurden in 74 unabhängig voneinander geführten Tests geprüft.

Bei zwei negativen Seren wurden Titer von < 1:8 gefunden.

Unter der Annahme, dass die positiven Kontrollseren einen Titerbereich von  $\pm 1$  Titerstufe vom Sollwert einhalten, wurden bei 100 % der Ansätze diese Vorgaben erfüllt.

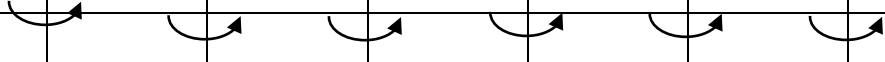

### Literatur

- 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 (Enders G. ed.) Urban & Schwarzenberg, München. S. 9 – 35

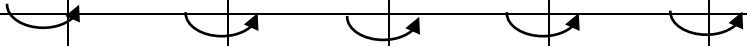
## Kurzanweisung: Pipettierschema

P = Puffer, S = Serum-Verdünnung 1 : 4, RA =Röteln-Antigen, HA = Test-Erythrozyten

### Serum-Titration und Serum-Kontrolle (Seite 3, 2.1.)

A 1:8	B 1:16	C 1:32	D 1:64	E 1:128	F 1:256	G 1:512	H Serum- Kontrolle
25 µl P <u>      </u>	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P
25 µl S							25 µl S
							
25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl P <u>      </u>
1. Inkubation (siehe Seite 4, 3.)							
25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA
2. Inkubation (siehe Seite 4, 5.)							

### Röteln-Antigen- und Erythrozyten-Kontrolle (Seite 3, 2.2.)

A 1:1	B 1:2	C 1:4	D 1:8	E 1:16	F 1:32	G Erythro- zyten Kontrolle	H Erythro- zyten Kontrolle
<u>      </u>	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P
50 µl RA						<u>      </u>	<u>      </u>
							
25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P
1. Inkubation (siehe Seite 4, 3.)							
25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA	25 µl HA
2. Inkubation (siehe Seite 4, 5.)							