



Gebrauchsinformation für Röteln-Fertigtest

Röteln-Hämagglutinations-Hemmtest (HHT bzw. HAH)
Ausgabe: 2009-01

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 erbracht, wenn der HAH-Titer mindestens 1: 32 beträgt ...**

Gelöscht:

Gelöscht: .

Test-Prinzip

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.

Hinweis

Wir bieten diesen Test mit zwei Puffervarianten an: die ursprüngliche Variante mit DGVA-Puffer und die neuere optimierte Variante mit Agglutestpuffer. Beide Systeme sind zertifiziert und können gleichberechtigt in den Labors eingesetzt werden. Die Gebrauchsanweisung geht auf beide Varianten ein, da sich nur geringfügige Unterschiede ergeben (siehe Punkt 5 bei der Testdurchführung und Gültigkeitskriterien bei der Testauswertung).

Reagenzien

Formatiert: Schriftart: 11 pt

Reagenz	Menge	Best.-Nr.
Adsorptionspuffer	7 ml	P-030
DGV-Puffer mit Manganchlorid und Heparin, gebrauchsfertig	50 ml	P-031
Adsorptions-Erythrozyten	7 ml	E-011
10 %ige Küken-Erythrozyten-Suspension in DGV-Puffer, aus frisch gewonnenem keimfreien Küken-Vollblut, gebrauchsfertig	20 ml 50 ml	E-021 E-051
Test-Antigen	5 ml	RA-010
Röteln-HA-Antigen, auf 4 – 8 hämagglutinierende Einheiten eingestellt, gebrauchsfertig	20 ml 50 ml	RA-012 RA-015
Test-Erythrozyten	7 ml	E-012
0,25 %ige Küken-Erythrozyten-Suspension in DGV-Puffer, aus frisch gewonnenem keimfreien Küken-Vollblut, fotometrisch eingestellt, gebrauchsfertig	20 ml 50 ml	E-022 E-013
Agglutestpuffer, gebrauchsfertig	19 ml	RT-001
Alternativ: DGV-Albumin-Puffer DGV-Puffer mit 0,2 % Albumin, gebrauchsfertig Die ursprüngliche Variante des Tests verwendet anstelle von Agglutestpuffer einen DGVA Puffer. Wird noch dieser Puffer verwendet, sind die Testanweisungen in Klammern zu befolgen.	50 ml	P-020

Zusätzlich erforderliches Material

Formatiert: Schriftart: 11 pt

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

Formatiert: Schriftart: 11 pt

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

Probenmaterial

Formatiert: Schriftart: 11 pt

Im Röteln-Fertigtest 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

1. Serum-Vorbehandlung

Formatiert: Schriftart: 13 pt

- 50 µl (100 µl) Serumprobe + 125 µl (250 µl) Adsorptionspuffer, mischen.
- 15 min bei + 2 °C bis + 8 °C inkubieren.
- + 250 µl (500 µl) Adsorptions-Erythrozyten, mischen.
- 30 – 60 min bei + 2 °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. Testansatz

Formatiert: Schriftart: 13 pt

Der Test wird auf Mikrotiter-Platten mit V-Form durchgeführt. Bei jedem Test-Ansatz müssen Kontroll-Seren mitgeführt werden (z. B. Best.-Nr. RS-030). Für die Gültigkeitskriterien des Tests werden zusätzlich eine Serumkontrolle (2.1.), eine Erythrozyten-Kontrolle (2.2.) und eine Röteln-Antigen-Kontrolle (2.2.) angesetzt.

Siehe Kurzanweisung Seite 7

2.1. Serum-Titration und Serum-Kontrolle

Formatiert: Schriftart: 11 pt

- In die Vertiefungen B bis H der Mikrotiterplatte je 25 µl Agglutestpuffer (ursprüngliche Testvariante: DGV-Albumin-Puffer) vorlegen.
- In die Vertiefungen A, B und H je 25 µl der Serumverdünnung 1:8 einfüllen.

Serum-Titration von 1:16 nach 1:512 (Mikrotiter-Platte B bis G)

- Aus Vertiefung B 25 µl in die Vertiefung C übertragen, mischen und weiter übertragen.
- Aus der Vertiefung G der Serumtitration (1:512) nach dem Mischen 25 µl entnehmen und verwerfen.
- In die Vertiefungen A bis G je 25 µl Röteln-Antigen pipettieren.

2.2. Röteln-Antigen- und Erythrozyten-Kontrolle

Formatiert: Schriftart: 11 pt

- In die Vertiefungen B bis H je 25 µl Agglutestpuffer (ursprüngliche Testvariante: DGV-Albumin-Puffer) vorlegen.
- In die Vertiefungen A und B je 25 µl Röteln-Antigen geben
- 25 µl von der Vertiefung B in die Vertiefung C übertitrieren, mischen und weiter übertragen.
- 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 Agglutestpuffer (ursprüngliche Testvariante: DGV-Albumin-Puffer) einfüllen.

3. Erste Inkubation

Formatiert: Schriftart: 13 pt

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

4. Test-Erythrozyten-Zugabe

Formatiert: Schriftart: 13 pt

- 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).

5. Zweite Inkubation

Formatiert: Schriftart: 13 pt

- ~~Zugedeckt 1 Stunde bei 37 °C ± 1 °C ohne Erschütterung stehen lassen.~~
(ursprüngliche Testvariante mit DGV-Albumin-Puffer)
- ~~Zugedeckt 1 Stunde bei + 2 °C bis + 8 °C ohne Erschütterung stehen lassen.~~

Formatiert: Einzug: Links: 1 cm, Hängend: 0,5 cm, Aufgezählt + Ebene: 1 + Ausgerichtet an: 0 cm + Tabstopp nach: 0,63 cm + Einzug bei: 0,63 cm, Tabstopps: Nicht an 0,63 cm

6. Ablesung

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

Formatiert: Nummerierung und Aufzählungszeichen

Gelöscht: .

Gelöscht: ¶

Formatiert: Einzug: Links: 0 cm, Erste Zeile: 0 cm

Gelöscht: ¶

Gelöscht: z

Gelöscht:)

Formatiert: Schriftart: 13 pt

Formatiert: Links, Zeilenabstand: 1,5 Zeilen

Gelöscht: ¶

Formatiert: Schriftart: 11 pt

Testauswertung

Gültigkeitskriterien

Die Ablesung ist nach 1 Stunde oder früher 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 Vertiefungen A – C / D (Antigen-Verdünnung 1:1 bis 1:8) sollen eine vollständige, danach eine abgestufte Hämagglutination aufweisen. (ursprüngliche Testvariante mit DGV-Albumin-Puffer: Die Vertiefungen A – 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

Formatiert: Schriftart: 11 pt, Kursiv

1. Knopfbildung in allen Vertiefungen - mögliche Ursachen

Gelöscht: -

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

2. Agglutination in allen Vertiefungen - mögliche Ursachen

Gelöscht: -

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

Beurteilung der Test-Ergebnisse

Formatiert: Schriftart: 11 pt

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.

Interpretation der Ergebnisse

Formatiert: Schriftart: 11 pt

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
$\geq 1:32$ IgM negativ	Immunität anzunehmen.	Keine Maßnahmen. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass auf Grund der erlaubten Titterschwankung 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 2. 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).
Negativ IgM negativ	Keine Antikörper nachweisbar.	Impfung erforderlich.

Gelöscht: ,

Gelöscht: oder FLUORIMMUN-Rubella

Spezifität und Sensitivität

Formatiert: Schriftart: 11 pt

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

- a) 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 %

- b) 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

Formatiert: Schriftart: 11 pt

- 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

Formatiert: Schriftart: 13 pt

P = Puffer, S = Serumverdünnung, RA = Röteln-Antigen, TE = Test-Erythrozyten

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

Formatiert: Zentriert

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	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 S
25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	25 µl RA	—
1. Inkubation (siehe Seite 4, 3.)							
25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE
2. Inkubation (siehe Seite 4, 5.)							

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

Formatiert: Zentriert

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
—	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P	25 µl P
25 µl RA	25 µl RA					—	—
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 TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE	25 µl TE
2. Inkubation (siehe Seite 4, 5.)							