ELI.H.A *Aspergillus*

Serologischer Aspergillose-Nachweis durch indirekte Hämagglutination

102 Tests
(Ref. 44602)

8000110-DE-2025-02
Für *in-vitro*-Diagnostik, für den professionellen Einsatz.
Die Änderungen seit der letzten Revision sind grau hinterlegt.

1 - VERWENDUNGSZWECK

ELI.H.A *Aspergillus* ermöglicht die quantitative Bestimmung von anti-*Aspergillus fumigatus* Serum-Antikörpern durch indirekte Hämagglutination.
Mit jedem Kit können 102 Tests oder 17 Reaktionen mit 6 Verdünnungen durchgeführt werden.

2 – EINLEITUNG

Aspergillus fumigatus ist die am häufigsten inkriminierte Spezies in der Humanpathologie.
A. fumigatus besitzt eine besondere Fähigkeit zur parasitären Anpassung an den Menschen.
Für seine Entwicklung sind jedoch bestimmte günstige Bedingungen erforderlich:
- lokale Bedingungen (vorgeformte Hohlräume, debridierte Lungenabszesse, geschädigte Schleimhäute...);
- allgemeine Bedingungen (Immunsuppression nach größeren chirurgischen oder medizinischen Eingriffen: Organtransplantation, immunsuppressive Therapie, Steroide, Antibiotika...).

3 – TESTPRINZIP

ELI.H.A *Aspergillus* basiert auf dem Prinzip der indirekten Hämagglutination. Die sensibilisierten roten Blutkörperchen bestehen aus roten Blutkörperchen von Schafen, die mit *Aspergillus fumigatus*-Antigen bschichtet sind.
Das Vorhandensein spezifischer Serum-Antikörper führt zur Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten, wodurch ein trüber rot-brauner Belag in der Vertiefung entsteht. In Abwesenheit spezifischer Antikörper bilden die roten Blutkörperchen eine ringförmige Ablagerung am Boden der Vertiefung.
Die nicht sensibilisierten Erythrozyten gewährleisten die Spezifität der Reaktion, so dass jegliche Störung durch die natürlichen Anti-Schaf-Agglutinine (Forssman-Heteroantikörper, infektiöse Mononukleose-Antikörper...) ausgeschlossen werden kann.
Die Reaktion wird in einer U-Mikrotiterplatte durchgeführt.
Die Handhabung ist einfach und schnell, die Ergebnisse liegen innerhalb von 2 Stunden vor.

4 – REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Beschreibung	Menge
R1: Röhrchen mit 2,2 ml sensibilisierten roten Blutkörperchen	**1**
R2: Röhrchen mit 1 ml nicht-sensibilisierten roten Blutkörperchen	**1**
BUF: Fläschchen mit 55 ml Phosphatpuffer-Lösung, pH 7,2	**1**
R3: Röhrchen mit 2 ml Adsorbens	**1**
CONTROL +: Röhrchen mit 0,2 ml titrierte Positivkontrolle	**1**
CONTROL -: Röhrchen mit 0,2 ml Negativkontrolle	**1**
MICROPLATE: Mikrotiterplatten (u-förmig)	**2**
DROPPER: Spezial-Dropper	**2**

5 – WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro*-Diagnostik und zur Testdurchführung durch qualifiziertes Laborpersonal.
- Tests nur zum Einmalgebrauch.
- Alle Reagenzien, mit Ausnahme des **BUF**-Reagenzes, enthalten Rohstoffe tierischen Ursprungs und müssen mit Vorsicht gehandhabt werden.
- Patientenproben sind potentiell infektiös. Sie müssen mit Vorsicht gehandhabt werden, unter Beachtung der Hygienevorschriften und der geltenden Bestimmungen für diese Art von Produkten im Land der Verwendung.
- Die Reagenzien enthalten Natriumazid (< 0.1%).
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfalldatums verwenden.
- Keine Reagenzien von verschiedenen Chargen verwenden.
- Die Reagenzien müssen vor dem Einsatz Raumtemperatur erreicht haben.
- Die Reagenzien **R1** und **R2** vor der Verwendung vorsichtig schütteln.
- Bei der Abgabe der Reagenzien **R1** und **R2** darauf, dass der Dropper genau senkrecht steht. Dafür sorgen, dass die Tropfen luftblasenfrei sind, da nur dann ein konstantes Volumen gewährleistet ist.

6 – PROBENENTNAHME UND PROBENHANDHABUNG

Frisches Serum oder bei -20°C konserviertes Serum verwenden, das keine Anzeichen von Hämolyse, Trübung oder Kontamination aufweist.
Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.
Keine Wärmevorbehandlung (Zersetzung) des Serums durchführen.

7 – STABILITÄT, LAGERUNG UND REAGENZIENVORBEREITUNG

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.
Alle Reagenzien sind, in der Originalverpackung bei 2-8°C gelagert, bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nicht einfrieren.

8 – ERFORDERLICHE MATERIALIEN (nicht im Kit enthalten)

- Automatische Pipette(n) mit einem an das zu messende Volumen angepassten Pipettiervolumen;
- Behälter für kontaminierte Abfälle;
- Zentrifuge;
- Hämolyseröhrchen.

9 – TESTDURCHFÜHRUNG

Vor Einsatz in den Test müssen alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreicht haben.

9.1 – Probenvorbereitung

Eine 1:40-Stammverdünnung des zu testenden Serums vornehmen:
- - 50 µl Serum;
- - 1,95 ml **BUF**-Reagenz.

9.2 – Test auf Mikrotiterplatte

- Mit einer Mehrkanalmikropipette in 8 Kavitäten der Mikrotiterplatte 50 µl **BUF** pipettieren.
- Mit einer Mikropipette 50 µl verdünntes Serum in die 1. Vertiefung geben.
  Das Serum mit dem BUF-Reagenz mischen und eine Verdünnungsreihe durchführen, indem 50 µl aus der 1. Vertiefung in die 2., dann 50 µl aus der 2. in die 3. und so weiter bis zur 6. Vertiefung übertragen werden. Danach 50 µl aus der 6. Vertiefung entnehmen und verwerfen. Auf diese Weise erhält man in den Vertiefungen 1 bis 6 Verdünnungen von 1:80 bis 1:2560.
- In die 7. Kavität 50 µl der 1 :40-Serum-Stammverdünnung pipettieren. Mit dem Puffer **(BUF)** mischen und 50 µl entnehmen und verwerfen. Diese 1:80-Verdünnung stellt die Serumkontrolle dar und dient dem Nachweis natürlicher anti-Schaf-Agglutinine, die in manchen Seren vorkommen können.
- **R1** und **R2** vorsichtig schütteln.
  - In die ersten 6 Vertiefungen jeweils 1 Tropfen **R1** geben.
  - In die 7. Vertiefung 1 Tropfen **R2** geben (Serumkontrolle).
  - In die 8. Vertiefung 1 Tropfen **R1** geben (Reagenzkontrolle). Dies dient der Richtigkeitskontrolle von **BUF** und **R1.**

Hinweis: Pro Testserie sollte nur 1 Reagenzkontrolle angesetzt werden.

- Inhalt der Vertiefungen sehr sorgfältig homogenisieren:
  - entweder manuell durch seitliches Beklopfen der Miktrotiterplattenränder
  - oder mit einem Vibrationsschüttler für Mikrotiterplatten (z.B. bei 1300 U/min für 10s) Keine Schüttler mit kreisförmigen Bewegungen (Orbital-, Kreisschüttler) einsetzen.
- Dann die Platte nicht mehr bewegen und frei von Vibrationen stehen lassen.
- 2 Stunden später das Reaktionsergebnis ablesen.

9.3 – Adsorption natürlicher anti-Schaf-Agglutinine im Falle einer Agglutination der Serumkontrolle

- **R3**-Reagenz vorsichtig schütteln.
- Folgendes in ein Röhrchen geben und mischen:
  - 0,1 ml Serum
  - 0,3 ml **R3**
- 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Bei 2000 U/min für 15 Minuten zentrifugieren.
- Flüssigen Überstand abnehmen; das Serum ist nun 1:4 verdünnt.
- Den Überstand mit **BUF** 1:10 verdünnen, um die adsorbierte 1:40-Stammverdünnung zu erhalten.
- Statt der Stammverdünnung wird diese adsorbierte Stammverdünnung als Testserum eingesetzt und der Test gemäß Anleitung Punkt 9.2 "Test auf Mikrotiterplatte" weitergeführt.

10 – BEOBACHTUNG / ABLESEN DER REAKTION

Negative Reaktion: **Keine Hämagglutination.**
Auf dem Boden der Vertiefung ist ein mehr oder weniger breiter Ring zu sehen.

Positive Reaktion: **Hämagglutination.**
Anwesenheit eines rötlich-braunen Belags auf dem Boden der Kavität; manchmal zeigt sich auch ein dünner peripherer Ring.

Beispiel einer mit einem 1:1280 positiven Serum erzielten Hämagglutination:

11 – INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Titer < 1:320: **Nicht-signifikante Reaktion.**
Es liegt wahrscheinlich keine invasive Aspergillose vor.
Test nach 2 bis 3 Wochen wiederholen und zusätzlich eine Gegenstrom-elektrophorese oder Immunelektrophorese durchführen.

Titer = 1:320: **Mehrdeutige Reaktion.**
Test nach 2 bis 3 Wochen wiederholen und zusätzlich eine Gegen-stromelektrophorese oder Immunelektrophorese durchführen

Titer ≥ 1:640: **Signifikante Reaktion spricht für eine invasive Aspergillose.**

12 – INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

CONTROL + und **CONTROL -** sind wie Patientenproben zu behandeln. Der Titer des Reagenz **CONTROL +** muss mit dem auf dem Fläschchenetikett aufgedruckten Titer ± eine Verdünnung übereinstimmen. **CONTROL -** darf keine Hämagglutination aufweisen. Liegt eine Hämagglutination vor, so ist der Test ungültig.

13 – FEHLERURSACHEN UND GRENZEN DER METHODE

- Schlechte Konservierung des Serums.
- Schlechte Konservierung der Reagenzien nach dem Öffnen.
- Nur die im Kit enthaltenen Dropper verwenden.
- Die Dropper dürfen nicht zwischen den Reagenzien **R1** und **R2** ausgetauscht werden.
- Bei positiver Reaktion in den ersten 6 Vertiefungen ist eine weitere Verdünnungsreihe durchzuführen, um die Titergrenze der Hämagglutination zu bestimmen.
- Die Serumkontrolle muss eine negative Reaktion zeigen (Ring). Im Falle einer Hämagglutination dieser Kontrolle muss der Test wiederholt werden, nachdem die natürlichen Anti-Schaf-Agglutinine durch Adsorption aus dem Serum entfernt wurden.
- Die Reagenzkontrolle muss eine negative Reaktion zeigen (Ring). Im Falle einer Hämagglutination dieser Kontrolle kann der **ELI.H.A *Aspergillus*** nicht verwendet werden.
- Seren, deren Antikörperkonzentration sehr hoch ist, können in den ersten Verdünnungen ein Zonenphänomen (mit Verschwinden der Trübung) hervorrufen, das in den nachfolgenden Verdünnungen wieder verschwindet.
- Die Qualität der Reagenzien ermöglicht es, die Reaktion am Abend durchzuführen und den Test am nächsten Morgen abzulesen, vorausgesetzt, die Mikrotiterplatte wird in keiner Weise bewegt und vor Erschütterungen geschützt.
- In allen Fällen müssen die klinischen, epidemiologischen und biologischen Daten vollständig berücksichtigt werden, bevor die endgültige Diagnose gestellt wird.

14 – LEISTUNGSDATEN

ELI.H.A *Aspergillus* besteht aus roten Blutkörperchen, die mit *Aspergillus fumigatus*-Antigen sensibilisiert sind, das die Spezifität und Sensitivität der indirekten Hämagglutinationsreaktion gewährleistet.
Die Ergebnisse der Testauswertungen zeigen, eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 98%.

15 – ABFALLBESEITIGUNG

Die Abfälle sollten gemäß den Hygienevorschriften und den geltenden Bestimmungen für diese Art von Produkten im Land der Verwendung entsorgt werden.
Wenn das **BUF**-Reagenz verschüttet wird, dann den Arbeitsbereich mit saugfähigem Papier reinigen und mit Wasser abspülen.
Wenn ein Serum oder ein anderes Reagenz auf dem Arbeitsbereich verschüttet wird, diesen mit Bleichmittel und saugfähigem Papier reinigen.

16 – LITERATUR

1. J. CAPDEVILLE, S. FIABANE - Diagnostic immunologique des aspergilloses - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XII, N° 121, 205-249.
2. B. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, N° 123, 417-455.
3. J.-M. SENET, C. BRISSET - The diagnosis of aspergillosis by passive haemagglutination - *Biomedicine*, 1973, 19, 365-368.
4. J-M. SENET, R. ROBERT, E. PICHOT - Intérêt de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic précoce del'aspergillose - *Bulletin de la Société de Mycologie Médicale*, 1974, Tome III, N° 1, 45-48.
5. J-M. SENET, R. ROBERT – Intérêt de l'hémagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmose et à l'aspergillose - *Archives Médicales de l'Ouest*, 1979, Tome 11, N° 1, 39-42.
6. A. CULINO, M. MIEGEVILLE, O.MORIN – Apports de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic de l'aspergilose pulmonaire – *Feuillets de Biologie*, 1984, Vol. XXV, N°137, 51/57.
7. M. MIEGEVILLE, O. MORIN, C. VERMEIL - Etude sérologique rétrospective concernant une série d'aspergillose chez des malades à "hauts risques" - *Feuillets de Biologie*, 1986, Vol. XXVII, N° 148, 37-39.
8. M.-C. GBADAMASSI, C. CIVADIER, T.SANDRE, T.-H. DUONG, C. COMBESCOT – Diagnostic immunologique de l'aspergillose : Proposition de l'association de deux techniques facilement mises en œuvre au laboratoire – *Feuillets de Biologie*, 1989, Vol. XXX, N°169, 31-34.

Die Änderungen seit der letzten Revision sind grau hinterlegt.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
http://www.elitechgroup.com