Hantavirus IF Test

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Humanantikörpern gegen Hantaviren (Dobrava/Hantaan, Puumala)

Dobrava/ Hantaan	**Art. Nr.**	**PR77065**
Puumala	**Art. Nr.**	**PR77056**

Inhalt: **je 6 × 10 Bestimmungen**
Lagerung: **2 - 8°C**

CE IVD

Objektträger jeweils separat erhältlich:

Dobrava/ Hantaan	Art. Nr.	PR97065
Puumala	Art. Nr.	PR97056

Inhalt: je 6 x 10 Bestimmungen

Gebrauchsanweisung/ Instruction sheet / Carnet d'instruction / instrucciones de uso / gebruiksaanwijzing / istruzioni per l'uso / σελίδα οδηγιών / bruksanvisning / modo de emprego: www.progen.com

1. Einleitung

Verschiedene Hantavirus-Serotypen verursachen in Asien und Europa eine Reihe von Erkrankungen, die als Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) zusammengefasst werden.

Hantaviren rufen bei Nagetieren eine inapparente Infektion hervor. Die Übertragung vom Tier auf den Menschen erfolgt durch Aerosole oder durch direkten Kontakt. Die Dobrava/Hantaan-Serotypen (DOB/HTN) verursachen eine schwere Verlaufsform von HFRS und kommen hauptsächlich in Asien sowie in östlichen Teilen Europas und den Mittelmeerländern vor. In Skandinavien, Mitteleuropa und Russland ist der Puumala-Serotyp (PUU) verantwortlich für eine milde Form des HFRS, die Nephropathia epidemica. Eine vor allem in urbanen Regionen - hauptsächlich in Asien - auftretende Form des HFRS wird durch Viren des Seoul-Serotyps hervorgerufen. Der Krankheitsverlauf ist jedoch milder als bei den DOB/HTN-Virustypen.

HFRS ist eine fieberhafte Erkrankung und kann zu akutem Nierenversagen führen: Charakteristisch für die Frühphase sind Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, in manchen Fällen mit Beteiligung des Respirationstraktes, gefolgt von Abdominal- und Rückenschmerzen, Erbrechen und Oligurie. 4-10 Tage nach Erkrankungsbeginn kann akutes Nierenversagen einsetzen und eine vorübergehende Dialyse erforderlich machen.

Die Initialdiagnose einer Hantavirus-Infektion beruht auf klinischen Symptomen und sollte serologisch bestätigt werden. Es existiert eine einseitige Kreuzreaktion zwischen DOB/HTN und anderen Serotypen. Patientenseren mit Antikörpern gegen Puumala reagieren meist auch mit DOB/HTN. Antikörper gegen Seoul-Virus sind meist auch im DOB/HTN-IF-Test nachweisbar.

Wenige Tage nach Beginn der Erkrankung sind bereits IgM-Antikörper nachweisbar, und diese erreichen nach 2-3 Wochen maximale Titer. IgG-Antikörper werden ebenfalls früh gebildet und können über Jahre persistieren.

2. Testanwendung

PROGENs Hantavirus IF Test ist eine indirekte Immunfluoreszenzmethode zum Nachweis von anti-Hantavirus-Antikörpern (DOB/HTN, PUU) in Patientenseren: Als Antigen dienen Hantavirus (HTN, PUU)-infizierte Zellen, die mit nicht-infizierten Kontrollzellen gemischt sind.

3. Testprinzip

Im ersten Schritt wird Patientenserum auf einem Virusbeschichteten Mehrfeldobjektträger inkubiert. Sind spezifische Antikörper im Serum, so binden diese und werden nicht weggewaschen. Gibt man danach konjugierte anti-human-IgG- und IgM-Antikörper auf das Reaktionsfeld, so binden diese an die Humanantikörper. Nach erneutem Waschen wird der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Im Falle einer positiven Reaktion sind die in situ gebildeten Immunkomplexe als gelbgrün fluoreszierende Hantaviruspartikel im Zytoplasma der rot gegengefärbten Zellen zu sehen. Ob andere Serotypen außer DOB, HTN, PUU mit dem Test kreuz reagieren, wurde nicht getestet.

4. Benötigte, nicht mitgelieferte Reagenzien, Materialien und Geräte

Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC und Evans Blau
Deckgläser (24 × 60 mm)
Präzisionspipetten (10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl)
Feuchte Kammer (z. B. Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier)
Destilliertes Wasser
Färbeküvetten
Einmalhandschuhe
Stoppuhr

5. Inhalt der Testpackung

GS, 6 einzeln verpackte 10-Feld-Objektträger mit fixierten Virus-infizierten und nichtinfizierten Zellen.

POS G, Positive Kontrolle für IgG Antikörper, Human - serum mit Stabilisator und Konservierungsstoff (lyophilisiert), 1 Fläschchen,. In 0,4 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.

POS M, Positive Kontrolle für IgM Antikörper, von IgG Antikörpern vorabsorbiertes Humanserum mit Stabilisator und Konservierungsstoff (lyophilisiert), 1 Fläschchen. In 0,2 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.

NEG, Negative Kontrolle, Humanserum mit Stabilisator und Konservierungsstoff (lyophilisiert), 1 Fläschchen. In 0,4 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.

CON G/M, Ziege-anti-human-IgG/IgM-Alexa Fluor 488 Konjugat (lyophilisiert), enthält Evans Blue als Gegenfarbstoff. 1 Fläschchen. In 2 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.

M, Eindeckmedium, enthält Konservierungsmittel, 1 Fläschchen, 2 ml. Gebrauchsfertig!

PBS, Phosphat gepufferte Saline (PBS), 2 Behälter, je 10 g. Den Inhalt eines Behälters in 1 l destilliertem Wasser auflösen.

6. Stabilität

Alle in der Packung enthaltenen Komponenten sind bei 2-8°C ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Stabilität rekonstituierter Lösungen bei 2-8°C:

Komponente	Stabilität
POS G, POS M **NEG** **CON G/M**	4 Wochen
PBS	1 Woche (Bei längerer Aufbewahrung: Zugabe von 0,05% (w/v) Natriumazid.

7. Vorbereitung

7.1. Probenmaterial und -lagerung

Als Probenmaterial für den Hantavirus IF Test dient Humanserum. Die unverdünnten Proben können bis zu 6 Wochen bei 2-8°C, bzw. mehrere Monate bei -20°C (unverdünnt) gelagert werden. Die Proben dürfen nicht mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden.

7.2. Probenvorbereitung

1. Anfangsverdünnung, **1:16**; 10 µl Patientenserum werden in 150 µl PBS Lösung verdünnt.
2. Verdünnung **1:32**; 100 µl der Anfangsverdünnung mit 100 µl PBS Lösung mischen.
3. Titerbestimmung: in 2er Verdünnungsstufen; je 0,1 ml Serumverdünnung mit jeweils 0,1 ml PBS-Lösung verdünnen

8. Testdurchführung

1. Den Testkit auf Raumtemperatur (20-26°C) bringen.
2. Hantavirus-beschichtete Objektträger vorsichtig aus der Folie nehmen und 2 Min. in PBS Lösung rehydrieren.
3. 20 µl jeder Patientenserumverdünnung auf einzelne Felder auftragen.
4. 20 µl positive Kontrolle G (Fluoreszenz 3+) und/ oder 20 µl positive Kontrolle M (Fluoreszenz 3+) auf ein Feld auftragen.
5. 20 µl negative Kontrolle auf ein weiteres Feld auftragen. Bei jeder Testdurchführung die relevanten Kontrollen mitführen.
6. Objektträger in einer feuchten Kammer 30 Min. bei Raumtemperatur (20-26°C) inkubieren.
7. Serumverdünnungen absaugen, und den Objektträger in 2 nachfolgenden Bädern mit PBS-Lösung je 5 Min. eintauchen. Überschüssige Flüssigkeit ablaufen und Objektträger lufttrocknen lassen.
8. Jedes Feld mit 20 µl rekonstituiertem CON G/M bedecken.
9. Objektträger in der feuchten Kammer 30 Min. bei Raumtemperatur (20-26°C). inkubieren.
10. Absaugen und waschen wie in Schritt 7.
11. Auf den Objektträger 3 Tropfen Eindeckmedium geben und mit einem Deckglas bedecken.
12. Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachten (40×- oder 63×-Öl-Objektiv).

9. Hinweise

Gebrauch nur durch Fachpersonal!

Wichtig für Präzision und Richtigkeit

Inkubationstemperatur 20-26°C einhalten.

Inkubationszeit ±10% einhalten. Sie beginnt **nach** dem Pipettieren der letzten Probe.

Sicherheitshinweise

Trotz Fixierung sollten die Objektträger als potenziell infektiös betrachtet werden.

Kontrollseren sind als HBsAg-negativ, HIV-Antikörper-, HCV-Antikörper-negativ negativ getestet worden. Trotzdem sollten diese Komponenten wie die Proben als potenziell infektiös behandelt werden.

Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel. Nicht schlucken, Haut- und Schleimhautkontakt vermeiden!

Das Konjugat enthält Evans Blue (giftig, karzinogen und teratogen). Nicht schlucken, Haut- und Schleimhautkontakt vermeiden.

Sicherheitsdatenblatt wird auf Anfrage versendet.

Entsorgungshinweise

Bei der Beseitigung der Testpackung sind die nationalen gesetzlichen Bestimmungen in der jeweils aktuellen Fassung zu beachten. Chemikalien und Zubereitungen, die als Reststoffe anfallen, sind in der Regel Sonderabfälle. Besondere Hinweise zur Entsorgung sind zusätzlich im Sicherheitsdatenblatt aufgelistet.

Maßnahmen bei Beschädigung

Im Falle einer erheblichen Beschädigung der Testpackung ist der Hersteller zu benachrichtigen. Falls einzelne Komponenten erheblich beschädigt sind, sind diese nicht zur Testdurchführung zu verwenden. Sie sollten so lange aufbewahrt werden, bis der Transportschaden geregelt ist. Danach sollten sie ordnungsgemäß entsorgt werden.

10. Qualitätskontrolle

Die negative Kontrolle darf keine Fluoreszenz zeigen.

Die positiven Kontrollen müssen ein typisches brillantes Färbemuster zeigen: gelbgrüne runde Partikel im Zytoplasma der ausgestreckten rotgefärbten Zellen; nichtinfizierte Zellen sind nur rot gefärbt (etwa 15-20% der Zellen auf jedem Feld sind stark Virus-infiziert und zeigen das typische brillante Färbemuster mit positiven Seren).

11. Ergebnisse und Interpretation

Die Intensität der Fluoreszenz wird mit Hilfe des Positiv-Kontrollfeldes (3+) als Ablesestandard beurteilt:

3+	brillante gelbgrüne Fluoreszenz
2+	deutliche gelbgrüne Fluoreszenz
1+	schwache aber eindeutige Fluoreszenz
ø	keine Fluoreszenz

Der **Endtiter** ist der Kehrwert der höchsten Serumverdünnung, die noch "1+"-Fluoreszenz zeigt.

Ein 4-facher IgG-Titeranstieg deutet auf eine akute Hantavirus-Infektion hin.

Initiale Testung der Seren: Für eine erste Testung von Proben wird eine Serumverdünnung von 1:16 empfohlen. Seren mit positivem Ergebnis sollten austitriert

werden. Zeigen Seren eines Patienten, die am 1. und 10.-14. Tag entnommen wurden, eine Serokonversion (>4-facher Titeranstieg), so deutet dies auf eine akute Hantavirus-Infektion hin.

Titer < 16: keine Antikörper nachweisbar

Titer > 16: Serum sollte austitriert werden

Subklassen Testung:

Zur separaten Testung von IgM-Antikörpern, muss vorab das IgG abgetrennt werden (IgG Absorb Reagent, PROGEN Art. Nr. PR715).

Interpretation bei DOB/HTN IF Test

Bedingt durch die hohe Kreuzreaktivität [4, 6, 7] der Dobrava- und Hantaan-Viren, kann eine Zuordnung des die Infektion verursachenden Serotyps unter Berücksichtigung der Reiseanamnese der Patienten vorgenommen werden:

Wenn keine Reisetätigkeit außerhalb Europas vorliegt, kann von einer Dobrava-Virus Infektion ausgegangen werden

(Hinweise dazu sind den Ringversuchsunterlagen von Instand zu entnehmen).

Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten und sollte niemals als alleinige Grundlage für die Diagnosestellung und/ oder für therapeutische Maßnahmen dienen.

12. Einschränkungen

Jedes Färbemuster, das vom oben genannten abweicht wie z. B. Kernfärbung oder gleichartige Färbung von 100% der Zellen, muss als unspezifisch und in Bezug auf Hantavirus-Antikörper als nicht auswertbar betrachtet werden.

Es existiert eine einseitige Kreuzreaktion zwischen den Dobrava/Hantaan und anderen Serotypen. Patientenseren mit Antikörpern gegen Puumala reagieren meist auch mit DOB/HTN. Antikörper gegen Seoul-Virus sind meist auch im Dobrava/Hantaan IF-Test nachweisbar.

13. Evaluierung

Bei der Evaluierung der Hantavirus IF Teste wurden die Antikörper-Subklassen und die diagnostische Effizienz bestimmt.

a) IgG

Die Evaluierung der Hantavirus IF Teste erfolgte parallel mit dem Hantavirus (Puumala) IgG ELISA und dem Hantavirus (Dobrava/Hantaan) IgG ELISA.

Es ergab sich nachfolgende **diagnostische Effizienz**[a]:

PUU-IFT n = 29	HTN-IFT (DOB/HTN) n = 56	IFT / ELISA
88%	99%	DOB/HTN IgG ELISA
98%	84%	Puumala IgG ELISA

b) IgM

Die Evaluierung der Hantavirus IF Teste erfolgte parallel mit dem Hantavirus (Puumala) IgM ELISA und dem Hantavirus (Dobrava/Hantaan) IgM ELISA. Es ergab sich nachfolgende **diagnostische Effizienz**[a]:

PUU-IFT n = 25	HTN-IFT (DOB/HTN) n = 50	IFT / ELISA
74%	100%	DOB/HTN IgM ELISA
99%	62%	Puumala IgM ELISA

14. Literaturhinweise

1. Zöller L et al. Use of recombinant nucleocapsid proteins of the Hantaan and nephropathia epidemica serotypes of hantaviruses as immunodiagnostic agents J. Med. Virol. 39, 200-207 (1993)
2. Clement J, Mc Kenna P, Avsic Zupanc T, Skinner CR. Rat-transmitted hantavirus disease in Sarajevo. Lancet 344:131(1994)
3. Clement J, Heyman P, Colson P, Groeneveld PH. Spread of hantavirus infections in Europe. Lancet 347:771 (1996)
4. Brus-Sjölander K, Lundkvist A. Dobrava virus infection: serologic diagnosis and cross-reactions to other hantaviruses. J Virol Methods 80:137-143 (1999)
5. Togni G u. a.: Präanalytik. Schweiz. Med. Forum. 6 113-120 (2002)
6. Papa A. Genetic Detection of Dobrava/Belgrade Virus, Bulgaria. Letters, Emerg Infect Diseases, Vol. 17, No. 2 (2011)
7. Krüger DH, Schönrich G and Klempa B. Human Vaccines 7:6, 685-693 (June 2011)

PROGEN Biotechnik GmbH

PROGEN Biotechnik GmbH
Maaßstraße 30
69123 Heidelberg
Deutschland
Telefon +49 (0) 6221 8278-0
Telefax +49 (0) 6221 8278-24
www.progen.com
info@progen.com

Gültig ab: 08.07.2019

[a] Diagnostische Effizienz = Spezifität/2 + Sensitivität/2