

Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten

Immunoblot (IB)

Begriffe, Allgemeine methodenspezifische Anforderungen

DIN
58 967
Teil 40

Serodiagnosis of infectious and immune diseases; Immunoblot (IB); Terms, general method specific requirements

1 Anwendungsbereich und Zweck

Die Norm gilt für Untersuchungen bei Infektions- und Immunkrankheiten mit dem Immunoblot (IB). Sie legt die Anforderungen für den Nachweis von Antigenen bzw. Antikörpern mit diesem Testsystem fest.

Bei speziellen Anwendungsverfahren sind weitergehende Anforderungen zu beachten. Sie sind für erregerspezifische Antikörper in den Normen der Reihe DIN 58 969, für Antikörper bei Immunkrankheiten in den Normen der Reihe DIN 58 968 beschrieben.

Der Nachweis von Antikörpern gegen den Human-Immunschwäche-Virus HIV-1 oder HIV-2 ist in DIN 58 969 Teil 41*) festgelegt.

Zweck dieser Norm ist es, methodenspezifische Begriffe und Mindestanforderungen festzulegen, um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

2 Begriffe

Grundbegriffe der Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten nach DIN 58 967 Teil 10. Grundbegriffe der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin nach DIN 58 936 Teil 1 und Teil 2.

2.1 Immunoblot (IB)

Der Immunoblot (IB) ist ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen (Antigenen) oder zum indirekten Nachweis von Antikörpern. Die Antigene werden an eine feste Phase (z.B. Trägermembran) gebunden. Die Identifizierung von Antigenen bzw. Antikörpern erlaubt zugleich deren Lokalisation auf der festen Phase. Die räumliche Zuordnung ist Voraussetzung für den Nachweis der nach molekularen Eigenschaften aufgetrennten und damit zusätzlich definierten Antigene oder sie betreffender Antikörper.

2.2 Feste Phase des IB

Die feste Phase des IB ist der Träger der Antigene bei der Reaktion mit Antikörpern.

2.3 Antigene für IB

Ein Antigen für IB ist eine Substanz, die in vivo eine Immunantwort auslösen und an eine feste Phase fixiert werden kann.

2.4 Transfer (blotten)

Als Transfer (blotten) wird der Vorgang bezeichnet, bei dem die Antigene mechanisch, elektrophoretisch oder mit einer anderen dafür geeigneten Methode auf die feste Phase aufgebracht werden.

2.5 Transferpuffer für IB

Der Transferpuffer für IB ist eine definierte Pufferlösung, in welcher die Antigene auf die feste Phase übertragen werden.

2.6 Blockierungspuffer für IB

Der Blockierungspuffer für IB ist eine definierte Pufferlösung, die Proteine, Polypeptide oder andere bindungsfähige Substanzen unter Ausschluß der nachzuweisenden Substanz enthält.

Nach Antigenbeladung blockiert sie die dann noch reaktiven Stellen der festen Phase. Dadurch wird eine unspezifische Reaktion der nachfolgenden Erkennungsschritte mit der festen Phase unterdrückt.

2.7 Waschpuffer für IB

Der Waschpuffer für IB ist ein flüssiges Medium mit definierter Ionenstärke und definiertem pH-Wert, mit dem an der festen Phase nichtimmunologisch gebundene Reaktionspartner entfernt werden.

2.8 Markierter Antikörper für IB

Ein markierter Antikörper für IB ist ein Immunglobulin (oder ein Teil davon), das hinsichtlich seiner Antigenbindungseigenschaften und der Immunglobulinklasse definiert ist. An dieses Immunglobulin ist ein Enzym, Farbstoff, Radioisotop oder ein anderes signalgebendes Molekül so gebunden, daß die Bindung des Immunglobulins an sein Antigen entweder direkt oder in einer nachfolgenden Reaktion indirekt lokalisiert sichtbar gemacht werden kann.

2.9 Antigenprofil des IB

Das Antigenprofil des IB ist das Reaktivitätsmuster von Antikörpern mit den auf einer festen Phase nach definierten Kriterien aufgetrennten Antigenbanden.

*) Z.Z. Entwurf

Fortsetzung Seite 2 bis 4

3 Bezeichnung

Bezeichnung der allgemeinen methodenspezifischen Anforderungen an den Immunoblot (IB) zum Nachweis von Antigenen und Antikörpern:

Nachweis DIN 58 967 — IB

4 Prinzip der Methode

Der IB dient dem Nachweis von Antigenen und Antikörpern. Beim Antigennachweis werden, sofern es sich nicht um definierte Substanzen handelt, Antigengemische mittels Elektrophorese, isoelektrischer Fokussierung oder anderen geeigneten Verfahren zunächst aufgetrennt. Die Antigene werden anschließend durch geregelte (z.B. Elektrotransfer) oder unregelmäßige Diffusion auf eine feste Phase (z.B. Trägermembran) übertragen. Dort werden sie nach Reaktionen mit definierten Antikörpern mittels eines Indikatorsystems nachgewiesen.

Beim Antikörpernachweis werden an die feste Phase gebundene, definierte Antigene zur Reaktion mit den nachzuweisenden Antikörpern angeboten (inkubiert). Die gebundenen Antikörper werden ihrerseits nachfolgend durch markierte Anti-Immunglobuline wie oben nachgewiesen.

5 Untersuchungsgut

Serum, Plasma und andere Körperflüssigkeiten.

Probenahme, Gewinnung des Untersuchungsgutes, Aufbewahrung und Transport bzw. Versand des Untersuchungsgutes nach DIN 58 967 Teil 10.

Sofern der Nachweis der Antikörperbindung an die Antigene mit einem enzymkonjugierten Immunglobulin geführt wird, dürfen die Proben keine Konservierungsmittel enthalten, welche die Enzymaktivität blockieren oder verfälschen können.

6 Annahme des Untersuchungsgutes

Nach DIN 58 967 Teil 10.

7 Untersuchungslaboratorium und spezielle Ausrüstung

Über die Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10 hinausgehend ist für den IB folgende Ausrüstung erforderlich:

- geeichte Pipetten
- Elektrophoresekammer mit Spannungsgleichrichter oder
- Flachbettkammer für isoelektrische Fokussierung in dünnen oder ultradünnen Gelen und entsprechendes Stromversorgungsgerät mit einstellbarer Wattbegrenzung
- Kammer für den Elektrotransfer oder entsprechendes Gerät für den mechanischen Transfer
- Magnetrührer
- Kühl-Gerät (Kammer; Schrank; Behälter o.ä.)
- Schüttler
- Absaugvorrichtung
- Geräte bzw. Behälter für die Entsorgung karzinogener, infektiöser oder umweltgefährdender, gegebenenfalls auch radioaktiver Substanzen; Anforderungen an die Entsorgung nach DIN 58 956 Teil 4.

8 Chemikalien und Reagenzien

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10

8.1 Feste Phase für IB

Die feste Phase für IB ist das Trägermaterial für die Immobilisation der Antigene. Es ist ein saugfähiges Material und muß hinsichtlich der Homogenität einer Charge und der Varianz zwischen verschiedenen Chargen in Bezug auf seine Bindungseigenschaften definiert sein. Seine Dicke und Porengröße müssen definiert werden.

8.2 Antigene für IB

Das Ausgangsmaterial für die Herstellung von Antigenen (z.B. Mikroorganismen, definierte Organzellen, u.a.) ist vor der Verarbeitung für den IB so zu stabilisieren (z.B. durch Zusatz von Proteaseinhibitoren), daß die sich daran anschließenden Auftrennungungsverfahren zu reproduzierbaren Ergebnissen führen.

Das Antigenmaterial muß in seiner Zusammensetzung so weitgehend wie möglich, mindestens aber hinsichtlich 50 % seiner Substanzen definiert sein. Unspezifisches Begleitmaterial (z.B. Proteine aus Zellkulturen oder Nährmedien) ist gegebenenfalls vorher abzutrennen.

Bei der Kombination SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und IB sind die Antigene nach ihrer relativen molekularen Masse (M_r) zu definieren, bei der Kombination isoelektrische Fokussierung (IEF) und IB hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes (IP).

Anmerkung: Antigene mit verschiedenen M_r können identische Epitope, Antigene mit gleicher M_r können verschiedene Epitope tragen. Analoges gilt für Antigene mit identischen oder verschiedenen IP's.

8.3 Transferpuffer für IB

Der Transferpuffer für IB wird für die Übertragung von Antigenen auf die feste Phase durch Diffusion, Elektroelution oder direktes Auftragen benötigt. Er darf keine unspezifisch proteolytische Aktivität besitzen. Spezielle Anforderungen werden für mikrobiologische Antigene in den Normen der Reihe DIN 58 969, für immunologische Antigene in den Normen der Reihe DIN 58 968 festgelegt.

8.4 Blockierungssubstanz für IB

Die Blockierungssubstanzen für IB im Blockierungspuffer müssen die freien Bindungsstellen auf der Filtermembran für die folgenden Reaktionen vollständig oder zumindest weitgehend unzugänglich machen. Blockierungssubstanzen dürfen die zu untersuchenden Antigene nicht enthalten bzw. nicht mit den nachzuweisenden Antikörpern reagieren. Blockierungssubstanzen können zusätzlich zur Unterdrückung der unspezifischen Antikörperbindung an irrelevante Antigene dienen.

8.5 Waschpuffer für IB

Der Waschpuffer für IB muß hinsichtlich Ionenstärke, pH-Wert, Blockierungssubstanzen und anderen Zusätzen so beschaffen sein, daß der spezifische Reaktionsablauf des IB nicht beeinflusst wird und in allen nachfolgenden Reaktionen ein reproduzierbares Ergebnis sichergestellt ist. Er muß in der Lage sein, alle nach der Beschichtung unspezifisch an der festen Phase angelagerten Substanzen während der Waschkvorgänge möglichst vollständig von dieser zu entfernen. Der Waschpuffer darf keine proteolytische Aktivität besitzen.