

Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten

Immunoblot (IB)

Begriffe, Allgemeine methodenspezifische Anforderungen

DIN
58967-40

ICS 07.100.10; 01.040.07

Ersatz für
Ausgabe 1991-10
Supersedes
1991-10 edition

Deskriptoren: Infektionskrankheit, Immunkrankheit, Diagnostik, Serodiagnostik, Immunoblot

Key words: Serodiagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system; Immunoblot (IB); Terms, general method-specific requirements

In case of doubt, the German-language version should be consulted as the authoritative text.

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für Untersuchungen bei Infektions- und Immunkrankheiten mit dem Immunoblot (IB). Sie legt 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 58969, für Antikörper bei Immunkrankheiten in den Normen der Reihe DIN 58968 beschrieben.

Der Nachweis von Antikörpern gegen den Human-Immunschwäche-Virus HIV-1 oder HIV-2 ist in DIN 58969 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 58967 Teil 10. Grundbegriffe der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin nach DIN 58936 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 der 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.

1 Scope and purpose

This standard applies to analyses with the immunoblot (IB) in case of infectious diseases and diseases of the immune system. It defines requirements of this test when used for the detection of antigens and antibodies, respectively.

For specific applications, additional requirements are to be considered. Antibodies specific to other infectious agents are covered by the standards of the series DIN 58969, those related to diseases of the immune system are covered by the series of standards DIN 58968.

The detection of antibodies against the Human Immunodeficiency Virus (HIV-1 or HIV-2) is covered in DIN 58969 Part 41.

The objective of this standard is to define terms and minimum requirements specific for the test method in order to achieve comparable and reproducible results.

2 Definitions

Basic definitions for the serodiagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system according to DIN 58967 Part 10. Basic terms for quality assurance in laboratory medicine according to DIN 58936 Part 1 and Part 2.

2.1 Immunoblot (IB)

The immunoblot (IB) is a method for identification of substances (antigens) or the indirect detection of antibodies. Antigens are bound to a solid phase (e.g. membrane carrier). The identification of antigens and antibodies simultaneously permits their localization on the solid phase. The local allocation is the prerequisite for the identification of antigens, which have been separated according to their molecular properties and thus further characterized, or their respective antibodies.

2.2 Solid phase of IB

The solid phase of IB is the carrier of the antigens during the reaction with antibodies.

2.3 Antigens for IB

An antigen for IB is a substance which elicits an immune response in vivo and can be fixed to a solid phase.

2.4 Blotting

Blotting is the term for the procedure by which antigens are transferred to the solid phase mechanically, by electrophoresis or by another suitable method.

Fortsetzung Seite 2 bis 7

Continued on pages 2 to 8

Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

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.

3 Bezeichnung

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

Nachweis DIN 58967 – 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 anderer geeigneter Verfahren zunächst aufgetrennt. Die Antigene werden anschließend durch geregelte (z. B. Elektrotransfer) oder ungeregelte Elution 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 58967 Teil 10.

2.5 Blotting buffer for IB

The blotting buffer for IB is a defined buffer solution in which the antigens are transferred to the solid phase.

2.6 Blocking buffer for IB

The blocking buffer for IB is a defined buffer solution which contains proteins, polypeptides or other binding substances excluding the one to be detected.

After transfer of antigens, the blocking buffer blocks the remaining reactive sites of the solid phase, thereby suppressing non-specific reactions of the following detection steps with the solid phase.

2.7 Washing buffer for IB

The washing buffer for IB is a liquid medium with defined ionic strength and pH value used for removal of reactants non-immunologically bound to the solid phase.

2.8 Labeled antibody for IB

A labeled antibody for IB is an immunoglobulin (or a part of it) which is defined according to its antigen-binding properties and immunoglobulin heavy chain. An enzyme, dye, radio isotope or another signal-producing molecule is bound to this immunoglobulin in such a way as to render the binding of the immunoglobulin to its antigen visible either directly or indirectly by way of a subsequent reaction.

2.9 Antigen profile of IB

The antigen profile of IB is the pattern of antibody reactivity with the bands presenting the antigens, separated on the solid phase according to defined criteria.

3 Designation

Designation of the general, method-specific immunoblot (IB) requirements for detection of antigens and antibodies:

Identification DIN 58967 – IB

4 Principle of the method

The IB is used for the detection of antigens and antibodies. For the detection of antigens, if these are not defined substances, mixtures of antigens are first separated by means of electrophoresis, isoelectric focussing or other suitable methods. The antigens are then transferred to a solid phase (e.g. carrier membrane) by controlled (e.g. electrotransfer) or uncontrolled elution.

There they are detected by an indicator system after reaction with defined antibodies.

For the detection of antibodies, solid-phase bound, defined antigens are incubated in the presence of the antibodies to be detected. The bound antibodies are subsequently detected by labeled anti-immunoglobulins, as described above.

5 Specimens

Serum, plasma, and other body fluids.

Specimen collection, preparation of the specimen, storage, transport and shipment, respectively, are performed according to DIN 58967 Part 10.



Documents

Document Sharing Hub

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 58967 Teil 10.

7 Untersuchungslaboratorium und spezielle Ausrüstung

Über die Anforderungen nach DIN 58967 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 Elektrottransfer oder entsprechendes Gerät für den mechanischen Transfer
- Magnetrührer
- Kühl-Gerät (Kammer; Schrank; Behälter o. ä.)
- Schüttler
- Absaugvorrichtung
- Geräte bzw. Behältnisse für die Entsorgung karzinogener, infektiöser oder umweltgefährdender, ggf. auch radioaktiver Substanzen; Anforderungen an die Entsorgung nach DIN 58956 Teil 4.

8 Chemikalien und Reagenzien

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58967 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 Zellen u. a.) ist vor der Verarbeitung für den IB so zu stabilisieren (z. B. durch Zusatz von Proteaseinhibitoren), daß die sich daran anschließenden Auftrennungsvorgänge 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 IPs.

If detection of antibody binding to antigens is performed with an enzyme-conjugated immunoglobulin, the specimens shall not contain preservatives which may block or alter enzyme activity.

6 Acceptance of specimens

Performance according to DIN 58967 Part 10.

7 Test laboratory and specific equipment

In addition to the requirements of DIN 58967 Part 10, the following equipment is required for the Immunoblot:

- calibrated pipettes
- electrophoresis chamber with regulated power supply or
- flat bed chamber for isoelectric focussing in thin or ultrathin gels and corresponding voltage supply with adjustable watt controller
- chamber for electric blot or corresponding device for mechanical transfer
- magnetic stirrer
- refrigerating device (e.g. chamber; refrigerator; container)
- agitator
- aspirating device
- instruments and containers for the disposal of carcinogenic, infectious or polluting substances; if necessary, also disposal of radioactive substances; disposal requirements according to DIN 58956 Part 4.

8 Chemicals and reagents

General requirements according to DIN 58967 Part 10.

8.1 Solid phase for IB

The solid phase for IB is the carrier material for immobilization of the antigens. It is an absorbent material and shall be defined with respect to its binding characteristics concerning lot homogeneity and lot-to-lot variation. Its thickness and pore size have to be defined.

8.2 Antigens for IB

The starting material for production of antigens (e.g. microorganisms, defined cells, etc.) shall be stabilised prior to its processing for the IB (e.g. by adding of protease inhibitors), in order to achieve reproducible results in the subsequent separation procedures.

The composition of the antigen material shall be defined to the greatest possible extent, however at least for 50 % of the substances. Accompanying non-specific materials (such as proteins from cultured cells or culture media) shall be removed in prior steps if possible.

When combining SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and IB, the antigens shall be defined by their respective molecular volume (M_r). When isoelectric focusing (IEF) and IB are combined, antigens shall be defined by their isoelectric point (IP), etc.

NOTE: Antigens with different M_r can possess identical epitopes, while antigens with identical M_r can possess different epitopes. The same is true for antigens with identical or different IPs.