

Serodiagnostik von Infektionskrankheiten

Komplementbindungsreaktion (KBR)

DIN
58 969
Teil 10

Medical microbiology; serodiagnosis of infectious diseases; complement fixation reaction

Inhalt

	Seite		Seite
1 Anwendungsbereich und Zweck	1	10 Durchführung der Untersuchung	2
2 Begriffe	1	10.1 Herstellung und Einstellung der Erythrozyten-	2
3 Bezeichnung	1	suspension	2
4 Prinzip der Methode	1	10.2 Ambozeptor-Vorversuch	2
5 Untersuchungsgut	1	10.3 Herstellung des hämolytischen Systems	2
6 Untersuchungslaboratorium	1	10.4 Komplement(C)-Vorversuch	2
7 Annahme des Untersuchungsgutes	2	10.5 Antigen-Vorversuch	3
8 Chemikalien und Reagenzien	2	10.6 Nachweis von Antikörpern im Serum oder	3
8.1 Test- und Kontrollantigene	2	anderen Körperflüssigkeiten (Hauptversuch)	3
8.2 Kontroll- und Kalibrations- bzw. Referenzseren	2	10.7 Mitführen von Kontrollen	3
8.3 Komplement(C)	2	11 Auswertung	3
8.4 Schaferthozyten (E)	2	12 Befundbeurteilung	4
8.5 Ambozeptor (Hämolsin)	2	13 Befundmitteilung	4
8.6 Puffer und Lösungen	2	14 Qualitätssicherung	4
9 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes	2	Anhang A Technische Hinweise	4

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm ist für den Nachweis von Antikörpern mit der Komplementbindungsreaktion (KBR) mit Bestimmung des Endpunktes bei Personen mit Verdacht auf Infektionskrankheiten anzuwenden.

Zweck dieser Festlegungen ist es, in der Serodiagnostik von Laboratorium zu Laboratorium vergleichbare Untersuchungsergebnisse mit der KBR zu ermöglichen.

Die KBR eignet sich zum Nachweis von Antikörpern der Subklassen IgG1, IgG3 und der Klasse IgM. IgG4 sowie alle anderen Antikörperklassen und Subklassen können mit dieser Methode nicht direkt nachgewiesen werden.

In der Routinediagnostik von Infektionskrankheiten wird die KBR zum Nachweis von Antikörpern gegen Antigene von Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen und Helminthen eingesetzt. Weiterhin findet sie in der Syphilis-Serodiagnostik zum Nachweis von Antikörpern Anwendung, die sich gegen (körpereigene) Lipide richten (Cardiolipin-KBR).

2 Begriffe**2.1 Grundbegriffe**

Nach DIN 58 967 Teil 10

2.2 Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) mit Bestimmung des Endpunktes ist ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Infektionserreger, welches so angelegt ist, daß bei einem positiven Testergebnis ein akuter oder kurze oder längere Zeit zurückliegender Infekt mit dem entsprechenden Erreger angenommen werden kann. Nach langer Zeit zurückliegender Infektion sind Antikörper mit dem Verfahren häufig nicht mehr nachweisbar.

2.3 Ambozeptor

Ambozeptor ist eine Lösung komplementbindender Antikörper gegen Schaferthozyten-Oberflächenantigene.

3 Bezeichnung

Bezeichnung der Komplementbindungsreaktion (KBR) zum Nachweis von Antikörpern bei Infektionskrankheiten:

Antikörpernachweis DIN 58 969 – KBR

4 Prinzip der Methode

Die KBR ist ein indirekter Test. Zunächst wird das probeneigene Komplement durch Wärmebehandlung inaktiviert. Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen das jeweilige Testantigen wird zugesetztes heterologes Komplement durch die Immunkomplexe verbraucht. Der Verbrauch im ersten Reaktionsschritt wird durch einen zweiten Reaktionsschritt, d. h. den Zusatz des aus Schaferthozyten und Ambozeptor bestehenden hämolytischen Systems meßbar gemacht.

5 Untersuchungsgut

Probennahme, Gewinnung des Serums, Aufbewahrung und Versand des Untersuchungsgutes nach DIN 58 967 Teil 10.

6 Untersuchungslaboratorium

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

- Mikrotitrationsplatten mit rundem Boden
- eichgenaue Pipetten bzw. Verdünnungskämme

Fortsetzung Seite 2 bis 9

Bei Anwendung des Cyanhämoglobin-Verfahrens nach Abschnitt A2 werden benötigt:

- Photometer siehe DIN 58 960 Teil 1 und Teil 3
- Küvetten für photometrische Messungen, z. B. nach DIN 58 963 Teil 2

7 Annahme des Untersuchungsgutes

Nach DIN 58 967 Teil 10

8 Chemikalien und Reagenzien

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10

8.1 Test- und Kontrollantigene

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10

Die Gebrauchsverdünnung des Testantigens wird im Vorversuch nach Abschnitt 10.5 ermittelt.

8.2 Kontroll- und Kalibrations- bzw. Referenzseren

Für jeden Testansatz ist mindestens ein positives und ein negatives Kontrollserum erforderlich. Ein Kalibrations- bzw. Referenzserum kann mitgeführt werden. Keines der Seren darf eine komplement-aktivierende Wirkung aufweisen. Kontrollseren sind tiefgekühlt und portioniert bei mindestens -20°C zu lagern.

8.3 Komplement (C)

Als Komplementquelle dienen tierische Seren wie z. B. Meer-schweinchenserum. Die Seren müssen frei von Antikörpern sein, die mit dem Untersuchungsziel interferieren. Die Seren müssen unmittelbar nach Gewinnung in Gebrauchsportionen bei mindestens -70°C eingefroren, konserviert oder lyophilisiert werden.

Eingefrorene Komplementpräparationen sollen im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut werden.

Anmerkung: Stehenlassen von Komplementlösungen führt zu deren Inaktivierung.

Konservierungsmittel siehe Abschnitt A 1.3.

8.4 Schaferythrozyten (E)

Steril entnommenes Schafblut wird in modifizierter Alsever-Lösung (siehe Abschnitt A 1.2) konserviert. Bakterienfrei ist das konservierte Schafblut bei 4°C etwa 1 Monat haltbar. Zum Gebrauch müssen die Erythrozyten durch dreimaliges Aufschwemmen und Zentrifugieren bei 800 RZB¹⁾ in einem 10fachen Überschuß von phenobarbital-gepuffter NaCl-Lösung nach Abschnitt 8.6.1 gewaschen werden. Die Waschschritte müssen auch bei käuflich erworbenen Erythrozyten-suspensionen durchgeführt werden.

8.5 Ambozeptor (Hämolyse)

Ambozeptor wird durch Immunisierung z. B. von Kaninchen mit Stromata von Schaferythrozyten gewonnen. Alternativ sind auch monoklonale Antikörper verwendbar. Ambozeptor muß nach Herstellerangaben oder kühl (bei $\approx 4^{\circ}\text{C}$) gelagert werden. Vor Gebrauch muß die fehlende Komplementaktivität gesichert werden, z. B. durch Inaktivierung für 30 min bei 56°C .

8.6 Puffer und Lösungen

Siehe auch Abschnitt A 1

1) RZB = Relative Zentrifugalbeschleunigung
(siehe DIN 58 970 Teil 1)

8.6.1 Phenobarbital-gepufferte Kochsalzlösung

- Stammlösung A:

Natriumchlorid p. a.	83,0 g
Natrium diethylbarbituricum	10,19 g

in 1500 ml Aqua dest. lösen. Dieser Lösung 34,6 ml Salzsäure mit einer Stoffmengenkonzentration $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ zufügen.

- Stammlösung B:

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	20,33 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	4,40 g

in 100 ml Aqua dest. lösen.

Die Stammlösungen A und B sollen getrennt bei 4°C aufbewahrt werden.

- Herstellung der Gebrauchslösung (pH 7,3):

5 ml Stammlösung B der Stammlösung A zusetzen und mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen. Diese Stammlösung (A + B) unmittelbar vor dem Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. zur Gebrauchslösung verdünnen. Auf Einhaltung des pH-Wertes von 7,3 ist zu achten.

9 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes

Die Eigenkomplementaktivität der zu untersuchenden Serumproben muß durch Wärmebehandlung für 30 min bei 56°C im Wasserbad ausgeschaltet werden.

10 Durchführung der Untersuchung

10.1 Herstellung und Einstellung der Erythrozyten-suspension

Für alle Versuche (Vorversuche und Hauptversuch) nach den Abschnitten 10.2 bis 10.6 sind die nach Abschnitt 8.4 gewaschenen Schaferythrozyten (E) auf eine definierte Volumenkonzentration von 1% v/v mit einer maximalen Fehlerbreite von 10% einzustellen, z. B. mit dem Cyanhämoglobin-Verfahren nach Abschnitt A 2.

10.2 Ambozeptor-Vorversuch

Entsprechend dem Arbeitsschema nach Abschnitt A 3.1 ist für jede Hämolyse-Charge die optimale Dosis zur Sensibilisierung der Erythrozyten zu ermitteln. Der Titer der agglutinierenden Antikörper des Ambozeptors muß mindestens 1 Verdünnungsstufe unter der Ambozeptorgebrauchsverdünnung liegen. Ambozeptor-Chargen mit einem hämolysierenden Titer von weniger als 1:1500 sind ungeeignet für die Reaktion und dürfen nicht verwendet werden.

Für den Hauptversuch nach Abschnitt 10.6 sollen die Erythrozyten mit 4 Hämolyse-Einheiten sensibilisiert werden, wobei 1 Einheit in derjenigen Verdünnung enthalten ist, welche im Vorversuch gerade noch zu einer vollständigen Hämolyse geführt hat.

10.3 Herstellung des hämolytischen Systems

Die auf 1% eingestellte Erythrozyten-Suspension wird zu gleichen Teilen mit der im Vorversuch nach Abschnitt 10.2 ermittelten Hämolyse-Gebrauchsverdünnung (4 Hämolyse-Einheiten) gemischt und vor dem Gebrauch 20 min bei 37°C unter mehrfachem kräftigen Schütteln inkubiert.

Das hämolytische System kann bis zu einer Woche verwendet werden, sofern im Überstand keine Hämolyse festgestellt wird. Es ist bei 4°C aufzubewahren.

10.4 Komplement(C)-Vorversuch

Der C-Vorversuch dient der Feststellung der C-Gebrauchsdosis im Hauptversuch nach Abschnitt 10.6 und muß deshalb in Gegenwart der Antigen-Gebrauchsdosis nach Abschnitt 10.5 durchgeführt werden.

Es ist eine C-Verdünnungsreihe bei 4 °C im Makrosystem (Röhrchen) herzustellen, siehe Abschnitt A 3.2.1. Hierbei ist von einer Verdünnung von 1:10 in phenobarbitalgepufferter Kochsalzlösung auszugehen. Sie muß in einem Volumen von mindestens 10 ml hergestellt sein. Für jeden Verdünnungsschritt ist eine unbenutzte Pipette zu verwenden. Die so hergestellten Komplement-Verdünnungen werden im zweiten Teil des Komplement-Vorversuchs zusammen mit Antigen und hämolytischem System eingesetzt. Ein Pipettier- und Inkubationsschema ist im Abschnitt A 3.2.2 angegeben.

Diejenige C-Verdünnung, welche unter den Bedingungen des zweiten Teils des C-Vorversuchs bei 37 °C noch eine vollständige Lyse ergibt, wird als 1 C-Einheit bezeichnet, siehe Abschnitt A 3.2.2. Im Hauptversuch wird mit 2 C-Einheiten gearbeitet. Sofern das verwendete C konserviert oder lyophilisiert gewesen bzw. portioniert gelagert war und mit einem standardisierten hämolytischen System (Laborstandard) gearbeitet wird, genügt es, den Komplement-Vorversuch nur dann zu wiederholen, wenn eine neue C-Charge in Gebrauch genommen wird oder die Charge konserviert, lyophilisiert oder entgegen den Festlegungen dieser Norm bei –20 °C länger als 3 Monate gelagert war.

10.5 Antigen-Vorversuch

Der Antigen-Vorversuch dient der Feststellung der Antigen-Gebrauchsdosis für den Hauptversuch nach Abschnitt 10.6. Es ist zu beachten, daß für jede Antigen-Präparation und jede Antigen-Verdünnung die zur Lyse notwendige C-Gebrauchsdosis nach Abschnitt 10.4 zuvor ermittelt sein muß. Die Antigen-Gebrauchsdosis wird mittels Schachbrett-Titration gegen Verdünnungen eines homologen Antiserums mit bekanntem Antikörpertiter festgestellt. Ein Arbeitsschema ist im Abschnitt A 3.3 dargestellt.

Die höchste Antigen-Verdünnung, welche mit der höchsten Antikörper-(Serum-) Verdünnung eine vollständige Hemmung der Hämolysen anzeigt, wird als 1 Antigen-Einheit bezeichnet. Im Hauptversuch wird mit 2 Antigen-Einheiten gearbeitet.

Das Ergebnis des Antigen-Vorversuchs gilt jeweils für eine Charge. Ein neuer Vorversuch ist anzusetzen, wenn die Antigen-Charge gewechselt wird oder der Titer des positiven Kontrollserums nicht mehr angezeigt wird.

10.6 Nachweis von Antikörpern im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten (Hauptversuch)

Anmerkung: Der Nachweis von Antikörpern im Untersuchungsgut kann qualitativ, d. h. in einer einzigen Probenverdünnung oder quantitativ, d. h. in einer Probenverdünnungsreihe, erfolgen. Da Reagenzien, Testansatz und Kontrollen bei qualitativem und quantitativem Antikörpernachweis gleich sind, wird nur der quantitative Hauptversuch dargestellt.

10.6.1 Reagenzien

- Phenobarbital-gepufferte Kochsalzlösung nach Abschnitt 8.6.1
- Antigen, in der durch den Vorversuch nach Abschnitt 10.5 ermittelten Gebrauchsverdünnung. Gegebenenfalls negatives Kontrollantigen in der gleichen Verdünnung.
- C-Gebrauchslösung, die für das jeweils verwendete Antigen in dem Vorversuch nach Abschnitt 10.4 ermittelt wurde.
- Hämolytisches System nach den Abschnitten 10.1 bis 10.3.

10.6.2 Untersuchung

Anmerkung: Mikrotiterplatten sind so zu beschriften, daß das Antigen (bzw. das negative Kontrollantigen), die Probe (Labornummer) und die Kontrollen nach Abschnitt 10.7 jederzeit zu identifizieren sind. Bei gleichzeitiger

Verwendung mehrerer Antigene in einem Hauptversuch sollte für jedes Antigen eine eigene Platte verwendet werden, um Verwechslungen auszuschließen.

Ein Arbeitsschema für eine Probe und ein Antigen ist im Abschnitt A 3.4 als Beispiel dargestellt.

Die Probenverdünnung in den einzelnen Vertiefungen der Platte ergibt sich aus der Anfangsverdünnung von 1:5. Bei speziellen Antigenen (z. B. FSME, LCM) ist eine Anfangsverdünnung von 1 : 2,5 notwendig.

Liquorproben sollen in der Regel unverdünnt eingesetzt werden.

Werden vergleichende Titerbestimmungen in aufeinanderfolgenden Serumproben desselben Patienten durchgeführt (Prüfung auf Titerveränderung), so sind diese in demselben Testansatz zu prüfen, um Einflüsse durch Schwankungen in verschiedenen Testansätzen zu minimieren.

10.6.3 Ablesen des Hämolysegrades

In den Vorversuchen und im Hauptversuch muß der Hämolysegrad unmittelbar nach dem letzten Arbeitsschritt abgelesen werden, siehe hierzu Anhang A, Tabellen A.1, A.3, A.4 und A.5.

10.7 Mitführen von Kontrollen

In jedem Hauptversuch müssen Antigenkontrollen, Komplementkontrollen, Kontrollen des hämolytischen Systems, Negativ- und Positivserumkontrollen mitgeführt werden. Einzelne Arbeitsschritte sind im Abschnitt A 3.4 dargestellt.

– Probenkontrolle

Die Probe darf in der niedersten verwendeten Verdünnung keine Komplementinaktivierung auslösen.

– Negative Kontrollantigene und Antigenkontrolle

Kontrollantigene müssen für jede Probe zur Absicherung der Spezifität mitgeführt werden. Am Versuchsende muß vollständige Hämolysen eingetreten sein. Bei der Antigenkontrolle muß ebenfalls am Versuchsende vollständige Hämolysen eingetreten sein.

– Komplementkontrolle

Am Versuchsende muß die Gebrauchsverdünnung und deren 1:2-Verdünnung vollständige Lyse zeigen; in den Verdünnungen 1:4 und 1:8 darf die Hämolysen nicht vollständig erkennbar sein. Idealerweise sollte die Hämolysen bei 1:4 etwa 50 % betragen.

– Kontrolle des hämolytischen Systems

Am Versuchsende darf keine Hämolysen eingetreten sein.

– Negativserumkontrolle

Am Versuchsende muß vollständige Hämolysen eingetreten sein.

– Positivserumkontrolle

Das positive Kontrollserum muß wie eine Probe in jedem Hauptversuch mitgeführt werden. Bei der Ablesung des Hauptversuchs darf der bekannte Antikörpertiter um nicht mehr als 1 Verdünnungsstufe über- bzw. unterschritten sein. Das Ergebnis kann zur Berechnung der Titereinheiten in den Proben nach Abschnitt A 4 verwendet werden.

– Mitführen von Kalibrations- bzw. Referenzseren

Zur quantitativen Kontrolle kann bei jedem Hauptversuchsansatz der aktuelle KBR-Titer von Kalibrations- bzw. Referenzseren bestimmt werden.

11 Auswertung

Der Titer (positives Testergebnis) ist der reziproke Wert der höchsten Verdünnung der Probe, die zu einer 50%igen Lyse des hämolytischen Systems geführt hat. Er bezieht sich allein auf die Verdünnung der Patientenprobe. Der Hämolysegrad kann am Durchmesser des Erythrozyten Sediments geschätzt werden.