

Medizinische Mikrobiologie
**Serologische und molekularbiologische Diagnostik
 von Infektionskrankheiten**
 Teil 10: Komplementbindungsreaktion (KBR)

DIN
58969-10

ICS 07.100.10

Ersatz für
Replacement for
 DIN 58969-10:1989-07

Medical microbiology — Diagnosis of infectious diseases in serology and
 molecular biology — Part 10: Complement fixation test (CFT)

Microbiologie médicale — Diagnose des maladies infectieuses en sérologie et
 biologie moléculaire — Partie 10: Réaction de fixation de complement (RFC)

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
1 Anwendungsbereich	3
2 Normative Verweisungen	3
3 Begriffe	3
4 Bezeichnung	4
5 Kurzbeschreibung	4
6 Untersuchungsgut	4
7 Untersuchungslaboratorium	5
8 Annahme des Untersuchungsgutes	5
9 Chemikalien und Reagenzien	5
9.1 Allgemeines	5
9.2 Test- und Kontrollantigene	5
9.3 Kontroll- und Kalibrations- bzw. Referenzseren	5
9.4 Komplement	6
9.5 Schaferythrozyten	6
9.6 Ambozeptor (Hämolyisin)	6
9.7 Puffer und Lösungen	6
10 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes	6
11 Durchführung der Untersuchung	7
11.1 Herstellung und Einstellung der Schaferythrozytensuspension	7
11.2 Ambozeptor-Vorversuch	7
11.3 Herstellung des hämolytischen Systems	7
11.4 Komplement-Vorversuch	7
11.5 Antigen-Vorversuch	8
11.6 Nachweis von Antikörpern im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten (Hauptversuch)	9
11.7 Mitführen von Kontrollen	10
12 Auswertung	11
13 Befundbeurteilung, Befundmitteilung, Befunddokumentation	11
13.1 Ergebnisse	11
13.2 Hinweise zur Befundinterpretation	11
13.3 Befundmitteilung	12
13.4 Befunddokumentation	13
14 Qualitätssicherung	13
Anhang A (normativ) Technische Hinweise	14
Literaturhinweise	27

Contents

	Page
Foreword	2
1 Scope	3
2 Normative references	3
3 Terms and Definitions	3
4 Designation	4
5 Abstract	4
6 Test material	4
7 Test laboratory	5
8 Reception of the test material	5
9 Chemicals and reagents	5
9.1 General	5
9.2 Test and control antigens	5
9.3 Control and calibration of reference sera	5
9.4 Complement	6
9.5 Sheep erythrocytes	6
9.6 Amboceptor (hemolysin)	6
9.7 Buffer and solutions	6
10 Pre-treatment of the test material	6
11 Test procedure	7
11.1 Preparation and adjustment of the erythrocyte suspension	7
11.2 Preliminary amboceptor testing	7
11.3 Preparation of the hemolytic system	7
11.4 Preliminary complement testing	7
11.5 Preliminary antigen testing	8
11.6 Detection of antibodies in serum or other body fluids (main test)	9
11.7 Inclusion of controls	10
12 Evaluation	11
13 Assessment, report and documentation of results	11
13.1 Results	11
13.2 Remarks on the interpretation of results	11
13.3 Report of findings	12
13.4 Documentation of findings	13
14 Quality assurance	13
Annex A (normative) Technical instructions	14
Bibliography	27

Fortsetzung Seite 2 bis 27

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

Änderungen

Gegenüber der DIN 58969-10:1989-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anpassung der Festlegungen an den Stand der Wissenschaft;
- b) Änderung des Haupttitels auf der Grundlage des erweiterten Anwendungsbereiches der Normen der Reihe DIN 58969.

Frühere Ausgaben

DIN 58969: 1989-07

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitsausschuss E 9 „Serologische und molekulare Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) erarbeitet.

DIN 58969 *Medizinische Mikrobiologie — Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten* besteht aus:

- Teil 10: Komplementbindungsreaktion (KBR)
- Teil 41: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen Human-Immunschwäche-Viren HIV-1 oder HIV-2
- Teil 42: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen an den Nachweis von Antikörpern gegen *Helicobacter pylori* (zz. in Vorbereitung)
- Teil 43: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen an den Nachweis von Antikörpern gegen *Yersinia* spp. (zz. in Vorbereitung)
- Teil 44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen an den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia* spp. (zz. in Vorbereitung)
- Teil 61: Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen der Human-Immunschwäche-Viren HIV-1 und HIV-2
- Teil 62: Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (MTC)
- Teil 64: Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen des Hepatitis-C-Virus (HCV) (zz. in Vorbereitung)

Amendments

Compared to DIN 58969-10:1989-07, the following changes were made:

- a) Adjustment of the provisions to the scientific knowledge.
- b) Revision of the main title according to the extended scope of series DIN 58969.

Former edition

DIN 58969: 1989-07

Foreword

This standard has been drafted by the technical committee E 9 “Serological and molecular diagnostics of infectious and immune diseases” of the *Normenausschuss Medizin im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.* (Medical Standards Committee at the German Institute for Standardisation).

DIN 58969 *Medical microbiology — Diagnosis of infectious diseases in serology and molecular biology* consists of:

- Part 10: Complement fixation test (CFT)
- Part 41: Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against Human Immunodeficiency Virus HIV-1 or HIV-2
- Part 42: Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against *Helicobacter pylori* (presently in preparation)
- Part 43: Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against *Yersinia* spp. (presently in preparation)
- Part 44: Immunoblot (IB); Special requirements for the detection of antibodies against *Borrelia* spp. (presently in preparation)
- Part 61: Polymerase chain reaction (PCR); Special requirements for the detection of nucleic acid sequences of the Human Immunodeficiency Viruses HIV-1 and HIV-2
- Part 62: Polymerase chain reaction (PCR); Special requirements for the detection of nucleic acid sequences of the *mycobacterium tuberculosis* complex (MTC)
- Part 64: Polymerase chain reaction (PCR); Special requirements for the detection of nucleic acid sequences of Hepatitis C Virus (HCV) (presently in preparation)

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren für den Nachweis von Antikörpern mit der Komplementbindungsreaktion (KBR) in Untersuchungsmaterial von Personen mit Verdacht auf Infektionskrankheiten fest.

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 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) Lipoide richten (Kardiopilin-KBR).

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 58967-10, *Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten — Teil 10: Begriffe, Allgemeine Anforderungen*.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die in DIN 58967-10 angegebenen und die folgenden Begriffe.

3.1

Komplementbindungsreaktion KBR

Verfahren mit Bestimmung des Endpunktes zum quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen Infektionserreger, welches so angelegt ist, dass bei einem positiven Testergebnis eine akute, rekurrende, chronische oder abgelaufene Infektion mit dem entsprechenden Erreger angenommen werden kann

1 Scope

This standard specifies a method for the detection of antibodies with the complement fixation test (CFT) in specimens from subjects suspected of having infectious diseases.

The purpose of this standard is to enable different serodiagnostic laboratories to obtain comparable results with the CFT.

The CFT is suitable for the detection of antibodies of sub-classes IgG 1, IgG 3, and class IgM. IgG 4 and other classes and sub-classes of antibodies cannot be detected by this method.

The CFT is used in the routine diagnosis of infectious diseases for the detection of antibodies against antigens of viruses, bacteria, fungi, protozoae, and helminths. Furthermore, it is used in the serodiagnosis of syphilis for the detection of antibodies which are directed against (endogenous) lipids (cardiolipin-CFT).

2 Normative references

This standard incorporates by dated and undated references, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this standard only when incorporated in it by amendments or revision. For undated references the latest edition of the publication referred to applies (including amendments).

DIN 58967-10, *Serodiagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system — Part 10: Definitions, general requirements*.

3 Terms and Definitions

For the purposes of this Standard, the terms and definitions given in DIN 58967-10 and the following apply.

3.1

complement fixation test CFT

procedure for the endpoint determination for the quantitative detection of antibodies against infectious pathogens set out to recognise a positive result in the assumption of an acute, recurring, chronic or past infection with the respective pathogen

ANMERKUNG Liegen Infektionen längere Zeit zurück, sind Antikörper mit der KBR häufig nicht mehr nachweisbar (abhängig vom Infektionserreger nach Wochen bzw. Monaten bzw. in Ausnahmen Jahren). Eine präzisere Bewertung des Zeitablaufs des Infektionsgeschehens kann nur nach Analyse einer zweiten Untersuchungsprobe (siehe 13.1) vorgenommen werden.

3.2 Komplementsystem

Verbindung Komplementproteine des klassischen Wegs, teilweise mit enzymatischer Aktivität, Proteine des alternativen Wegs sowie mehrerer Regulatorproteine, welche kaskadenförmig aktiviert werden

ANMERKUNG 1 Bei der Aktivierung werden drei Phasen unterschieden: Erkennung von Immunkomplexen und von Aktivatoren, Komplementaktivierung und Amplifikation sowie Bildung des Membranangriffskomplexes.

ANMERKUNG 2 Von den biologischen Funktionen des Komplementsystems spielt für die diagnostische Anwendung nur die „klassische“ Aktivierung durch Immunkomplexe mit nachfolgender Lyse von Zellmembranen eine Rolle.

3.3 Ambozeptor Hämolysin

Lösung komplementbindender Antikörper gegen Schaferythrozyten-Oberflächen-Antigene

4 Bezeichnung

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

Nachweis DIN 58969 – KBR

5 Kurzbeschreibung

Die KBR ist ein indirekter Test. Zunächst wird das probeneigene Komplement durch Inaktivierung bei 56 °C zerstört. Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen das jeweilige Testantigen wird zugesetztes heterologes Komplement durch die Immunkomplexe verbraucht. Der Verbrauch in der ersten Reaktion wird durch eine zweite Reaktion, d. h. den Zusatz des aus Schaferythrozyten und Ambozeptor bestehenden hämolytischen Systems, messbar gemacht.

6 Untersuchungsgut

Probenahme, Gewinnung von Serum, Liquor cerebrospinalis und anderen Körperflüssigkeiten. Aufbewahrung und Versand des Untersuchungsgutes nach DIN 58967-10.

NOTE If considerable time has elapsed since the infection it is often no longer possible to detect antibodies with the CFT (depending on the type of pathogen after weeks, months or exceptionally after years). A precise evaluation of the course of infection will only be possible after analysis of a second sample (see 13.1).

3.2 complement system

combination of complement proteins of the classical pathway, in part with enzymatic activity, proteins of the alternative pathway, as well as several regulator proteins which may consecutively be activated

NOTE 1 Three activation phases are to be distinguished: recognition of immune complexes and activators, complement activation and amplification as well as formation of the membrane attack complex.

NOTE 2 Among the biological functions of the complement system for diagnostic purposes only the immune complex mediated classical activation with subsequent lysis of cell-membranes plays a role.

3.3 amboceptor hemolysin

amboceptor is a solution of complement fixing antibodies against surface antigens of sheep erythrocytes

4 Designation

Designation of the complement fixation test (CFT) for the detection of antibodies in infectious diseases:

Detection DIN 58969 – CFT

5 Abstract

The CFT is an indirect test. Initially, the sample complement is inactivated at 56 °C. In the presence of antibodies against the relevant test antigen, heterologous complement added to the reaction mixture is consumed by immune complexes. Consumption within the first reaction will be detected in a second reaction, i.e. through the addition of the hemolytic system consisting of sheep erythrocytes and amboceptor.

6 Test material

Sampling, obtaining of serum, cerebrospinal fluid and other body fluids, storage and dispatching of the specimens according to DIN 58967-10.

ANMERKUNG Für die KBR geeignet sind Serum, Liquor cerebrospinalis und andere Körperflüssigkeiten.

NOTE Serum, cerebrospinal fluid and other body fluids are suitable for CFT.

7 Untersuchungslaboratorium

Über die Anforderungen nach DIN 58967-10 hinausgehend ist für die KBR zusätzlich folgende Ausstattung erforderlich:

- Mikrotitrationsplatten mit U-förmigen Vertiefungen
- eichgenaue Pipetten bzw. Verdünnungskämme

Bei Messung der Lyse durch ein photometrisches Verfahren nach A.2 werden benötigt:

- Photometer, z. B. nach DIN 58960-1 und DIN 58960-3
- Küvetten für photometrische Messungen, z. B. nach DIN 58963-2

8 Annahme des Untersuchungsgutes

Nach DIN 58967-10.

9 Chemikalien und Reagenzien

9.1 Allgemeines

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58967-10.

9.2 Test- und Kontrollantigene

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58967-10.

Die Gebrauchsverdünnung des Testantigens wird im Antigen-Vorversuch nach 11.5 ermittelt.

9.3 Kontroll- und Kalibrations- bzw. Referenzseren

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58967-10.

Für jeden Testansatz ist mindestens ein positives und ein negatives Kontrollserum erforderlich. Ein Kalibrations- bzw. Referenzserum darf mitgeführt werden. Keines der Seren darf eine endogene komplement-aktivierende Wirkung aufweisen (siehe Abschnitt 10).

7 Test laboratory

In addition to the specification described in DIN 58967-10, the following equipment is required for CFT:

- microtiter plates with U-shaped cavities;
- accurately calibrated pipettes or diluters.

Determining the degree of lysis using photometric methods according to A.2 the following will be required:

- photometer, e.g. according to DIN 58960-1 and DIN 58960-3;
- optical cells for photometric measurement, e.g. according to DIN 58963-2.

8 Reception of the test material

According to DIN 58967-10.

9 Chemicals and reagents

9.1 General

General requirements according to DIN 58967-10.

9.2 Test and control antigens

General requirements according to DIN 58967-10.

The preset dilution of the test antigen is determined in the preliminary antigen testing according to 11.5.

9.3 Control and calibration of reference sera

General specifications according to DIN 58967-10.

For each test procedure at least one positive and one negative control serum is required. A calibrator or reference serum may be used in parallel. None of the sera may show endogenous complement activation (see clause 10).

Als Komplementquelle dienen tierische Seren wie z. B. Meerschweinchenserum. Die Seren müssen frei von Antikörpern sein, die das Untersuchungsverfahren als Reaktanden beeinflussen. Die Seren müssen unmittelbar nach Gewinnung in Gebrauchsportionen bei mindestens $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, konserviert oder lyophilisiert werden.

Eingefrorenes Komplement sollte zügig aufgetaut und anschließend bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

Konservierungsmittel siehe A.1.4.

9.5 Schaferythrozyten

Steril entnommenes Schafblut wird in modifizierter Alsever-Lösung (siehe A.1.3) konserviert. Sterilität vorausgesetzt ist das konservierte Schafblut bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 1 Monat haltbar. Zum Gebrauch müssen die Erythrozyten durch dreimaliges Aufschwemmen und Zentrifugieren bei $800\text{ RZB}^{1)}$ in einem zehnfachen Überschuss von Barbitol-gepuffeter Kochsalzlösung nach A.1.2 gewaschen werden. Die Waschschrirte müssen auch bei käuflich erworbenen Erythrozyten-suspensionen durchgeführt werden, soweit vom Hersteller nicht ausdrücklich anders vorgeschrieben.

9.6 Ambozeptor (Hämolyisin)

Ambozeptor wird durch Immunisierung z. B. von Kaninchen mit Schaferythrozyten gewonnen. Ambozeptor muss kühl (bei etwa $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelagert werden, wenn der Hersteller keine andere Lagerungstemperatur angibt. Vor Gebrauch muss die Komplementaktivität durch Inaktivierung für 30 min bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ zerstört werden.

9.7 Puffer und Lösungen

Barbitol-gepufferte Kochsalzlösung: Zusammensetzung siehe A.1.2. Alternativ dürfen Barbiturat-freie Puffer verwendet werden, wenn ihre Gleichwertigkeit nachgewiesen wurde.

ANMERKUNG Betäubungsmittelgesetz siehe [1].

10 Vorbehandlung des Untersuchungsgutes

Die Eigenkomplementaktivität der zu untersuchenden Proben muss durch Inkubation für 30 min bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad ausgeschaltet werden.

9.4 Complement

As a source of complement, animal sera such as guinea-pig serum are used. The sera shall be free from antibodies interfering with the reagents of the test. As soon as they have been collected, sera shall be frozen in preset aliquots at least at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ or preserved or lyophilised.

Frozen preparations of complement should be rapidly thawed and subsequently stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

For preservatives, see A.1.4.

9.5 Sheep erythrocytes

Sterile samples of sheep blood are preserved in modified Alsever's solution (see A.1.3). If sterile, the preserved sheep blood can be stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for about one month. The erythrocytes to be used shall be washed by threefold suspending and centrifugation at $800\text{ r. c. a.}^{1)}$ (see DIN 58970-1) at tenfold excess of barbitol-buffered NaCl solution as described in A.1.2. Washing shall also be carried out with commercially obtained erythrocyte suspensions unless otherwise specified by the producer.

9.6 Amboceptor (hemolysin)

The amboceptor is obtained by immunisation, e.g. of rabbits with sheep erythrocytes. Amboceptor shall be kept cool (at approx. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), unless otherwise specified by the producer. Before use, complement activity shall be inactivated for 30 min at $56\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.7 Buffer and solutions

Barbitol-buffered NaCl: For chemical constituents see A.1.2. Alternatively, barbitol-free buffers may be used if they have been proven to be equivalent.

NOTE For controlled substances legislation see [1].

10 Pre-treatment of the test material

The endogenous complement activity of serum samples to be tested shall be eliminated by incubation for 30 min at $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a water bath.

¹⁾ RZB: Relative Zentrifugalbeschleunigung (siehe DIN 58970-1).
r. c. a. = relative centrifugal acceleration

11 Durchführung der Untersuchung

11.1 Herstellung und Einstellung der Schafer erythrozytensuspension

Für alle Versuche (Vorversuche und Hauptversuch) nach 11.2 bis 11.6 sind die nach 9.5 gewaschenen Schafer erythrozyten auf eine Volumenkonzentration von mindestens 1,5 % einzustellen, z. B. mit einem photometrischen Verfahren nach A.2. Für bestimmte Antigene können andere Volumenkonzentrationen (z. B. 2 % für Kardiopilin) erforderlich sein. Abweichende Erythrozytenkonzentrationen sind zulässig, wenn dies vom Hersteller angegeben ist.

11.2 Ambozeptor-Vorversuch

Entsprechend dem Arbeitsschema nach Tabelle A.1 ist für jede Ambozeptorcharge die optimale Dosis zur Sensibilisierung der Erythrozyten zu ermitteln. Für den Hauptversuch nach 11.6 sollten die Erythrozyten mit vier Ambozeptoreinheiten sensibilisiert werden, wobei eine Einheit in derjenigen Verdünnung enthalten ist, welche im Vorversuch gerade noch zu einer vollständigen Hämolyse geführt hat. Ambozeptorchargen, bei denen eine Einheit in einer Verdünnung von geringer als 1:1 500 vorliegt, sind für die Reaktion ungeeignet. Die Ambozeptorgebrauchsverdünnung muss außerhalb des Bereiches der agglutinierenden Wirkung liegen, die neben der hämolysierenden Eigenschaft – gewöhnlich in deutlich niedrigerer Konzentration – in den als Hämolysin verwendeten Antisera beobachtet wird. Der Agglutinationstiter sollte mindestens viermal geringer sein als in der Ambozeptor-Gebrauchsverdünnung. Die Vorgabe einer Ambozeptor-Gebrauchsverdünnung durch den Hersteller ist zulässig.

11.3 Herstellung des hämolytischen Systems

Die eingestellte Erythrozyten-Suspension wird zu gleichen Teilen mit der im Ambozeptor-Vorversuch nach 11.2 ermittelten Hämolysin-Gebrauchsverdünnung (vier Hämolysin-Einheiten) gemischt und vor dem Gebrauch 20 min bei 37 °C unter mehrfachem Schütteln inkubiert.

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

11.4 Komplement-Vorversuch

Der Komplement-Vorversuch dient der Feststellung der Komplement-Gebrauchsverdünnung im Hauptversuch nach 11.6 und muss deshalb in Gegenwart der Antigen-Gebrauchsverdünnung nach 11.5 durchgeführt werden.

11 Test procedure

11.1 Preparation and adjustment of the erythrocyte suspension

For all tests (preliminary tests and main tests) to be carried out as described in 11.2 to 11.6, the sheep erythrocytes washed according to 9.5 have to be adjusted to a concentration of at least 1,5 % by volume, e.g. by photometric determination according to A.2. For certain antigens other concentrations (e.g. 2 % for cardiolipin) may be necessary. Other erythrocyte concentrations will be acceptable if this is stated by the producer.

11.2 Preliminary amboceptor testing

According to the working scheme given in Table A.1, for each batch of hemolysin the optimum dose for sensitisation of erythrocytes is to be determined. In the main test according to 11.6 the erythrocytes should be sensitised with four units of amboceptor, where one unit will be a dilution which in pre-testing gave rise to complete hemolysis. Batches of amboceptor in which one unit is found in a dilution less than 1:1 500 are not suitable for the reaction. The amboceptor dilution used in the main test shall be above the agglutinating titer which is observed in hemolysin containing antisera (usually in much lower concentration). The agglutinating titer shall be at least four times less than the amboceptor test dilution. An amboceptor dilution for the main test prescribed by the producer is allowed.

11.3 Preparation of the hemolytic system

The erythrocyte suspension adjusted in pretesting is mixed in equal parts with the hemolysine preset dilution (four hemolysine units) determined in the preliminary amboceptor testing according to 11.2 and prior to use incubated for 20 min at 37 °C while repeatedly shaking.

The hemolytic system can be used up to one week, provided no hemolysis is detected. It shall be stored at 4 °C.

11.4 Preliminary complement testing

In the preliminary complement testing the preset complement dose for the main test as described in 11.6 is determined; it shall therefore be carried out in the presence of the preset antigen dose as stated in 11.5.

Es ist eine Komplement-Verdünnungsreihe (siehe Tabelle A.2) bei 4 °C herzustellen. Hierbei ist von einer Verdünnung von 1:10 in Barbitol-gepufferter Kochsalzlösung auszugehen. Bei jedem Verdünnungsschritt ist eine neue Pipette oder Pipettenspitze 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 in Tabelle A.3 angegeben.

Diejenige Komplement-Verdünnung, die unter den Bedingungen des zweiten Teils des Komplement-Vorversuchs bei 37 °C noch eine vollständige Lyse ergibt, wird als eine Komplement-Einheit bezeichnet (siehe A.3.2.2). Im Hauptversuch wird mit zwei Komplement-Einheiten gearbeitet. Sofern das verwendete Komplement konserviert oder lyophilisiert oder bei -70 °C portioniert gelagert war und mit einem standardisierten hämolytischen System (Laborstandard) gearbeitet wird, genügt es, den Komplement-Vorversuch nur dann zu wiederholen, wenn eine neue Komplement-Charge in Gebrauch genommen wird oder wenn sie länger als 3 Monate gelagert war.

11.5 Antigen-Vorversuch

Der Antigen-Vorversuch dient der Feststellung der Antigen-Gebrauchsverdünnung für den Hauptversuch nach 11.6. Es ist zu beachten, dass für jede Antigen-Präparation und jede Antigen-Verdünnung die zur Hämolyse notwendige Komplement-Gebrauchsverdünnung nach 11.4 vor dem Hauptversuch ermittelt sein muss. Die Antigen-Gebrauchsverdünnung wird mittels Schachbrett-Titration gegen Verdünnungen eines homologen Antiserums mit bekanntem Antikörpertiter festgestellt. Ein Arbeitsschema ist in Tabelle A.4 dargestellt. Als Antigen-Verdünnung für den Hauptversuch ist die doppelte Konzentration derjenigen Verdünnung zu wählen, die den Titer des Antiserums als Plateau angezeigt hat.

BEISPIEL Die Antigenverdünnung 1:100 zeigt den Antikörpertiter plateauförmig an (eine Antigen-Einheit). Dementsprechend ist die Antigengebrauchsverdünnung 1:50 (zwei Antigen-Einheiten).

Das Ergebnis des Antigen-Vorversuchs gilt jeweils für eine Charge. Wenn die Antigen-Charge gewechselt oder der Titer des positiven Kontrollserums nicht mehr angezeigt wird, muss ein neuer Antigen-Vorversuch angesetzt werden.

A complement dilution series (see table A.2) shall be prepared at 4 °C. Testing shall be started at a dilution of 1:10 in barbitol-buffered NaCl. For each dilution step a new pipette or tip shall be used. The complement dilutions prepared in this way are used in the second part of preliminary complement testing, together with antigen and the hemolytic system. A pipetting and incubating scheme is shown in table A.3.

A complement dilution which still yields complete lysis under the conditions of the second part of preliminary complement testing at 37 °C is defined as one complement unit (see A.3.2.2). Two complement units are employed in the main test. Provided that the complement has been preserved or lyophilised or stored in aliquots and is processed with a preset hemolytic system (laboratory standard), it is sufficient to repeat preliminary complement testing only when a new complement batch is to be used or if the batch has been preserved for longer than three months.

11.5 Preliminary antigen testing

The preliminary antigen serves as the determination of a preset antigen dose for the main test according to 11.6. It shall be considered that the preset complement dose required for lysis as described in 11.4 shall be determined for each antigen preparation and antigen dilution prior to the main test. The preset antigen dose is determined by means of checkerboard titration against dilutions of a homologous antiserum with a known antibody titer. A working scheme is shown in table A.4. As antigen dilution for the main test, twice the concentration of a dilution shall be chosen for which the titer of the antiserum has shown a plateau.

EXAMPLE The antigen dilution 1:100 shows an antibody titer plateau (one antigen unit). Thus, the antigen dilution to be used will be 1:50 (two antigen units).

The result of the preliminary antigen testing applies to one batch, respectively. If the antigen batch is changed or the titer of the positive control serum is no longer reached a new antigen preliminary testing shall be done.

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.

11.6.1 Reagenzien

11.6.1.1 Barbitol-gepufferte Kochsalzlösung nach 9.7 und A.1.2.

ANMERKUNG Betäubungsmittelgesetz siehe [1].

11.6.1.2 Antigen, in der durch den Antigen-Vorversuch nach 11.5 ermittelten Gebrauchsverdünnung. Gegebenenfalls negatives Kontrollantigen in der gleichen Verdünnung.

11.6.1.3 Komplement-Gebrauchslösung, die für das jeweils verwendete Antigen im Komplement-Vorversuch nach 11.4 ermittelt wurde.

11.6.1.4 Hämolytisches System nach 11.1 bis 11.3.

11.6.2 Untersuchung

Mikrotiterplatten sind so zu markieren, dass das Antigen (bzw. das negative Kontrollantigen), die Probe (Labornummer) und die Kontrollen nach 11.7 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 in Tabelle A.5 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-Virus/Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, LCM-Virus/Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus) ist eine Anfangsverdünnung von 1:2,5 notwendig.

Liquorproben sollten in der Regel unverdünnt eingesetzt werden.

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

11.6 Detection of antibodies in serum or other body fluids (main test)

NOTE The detection of antibodies in the test material may be qualitative, i.e. in a single dilution of the sample, or quantitative, i.e. in a series of sample dilutions. Since reagents, test procedure and controls are identical for the qualitative and quantitative detection of antibodies, only the quantitative method is shown in the main test.

11.6.1 Reagents

11.6.1.1 Barbitol-buffered saline according to 9.7 and A.1.2.

NOTE For controlled substances legislation see [1].

11.6.1.2 Antigen in the preset dilution determined in the preliminary antigen testing according to 11.5. If necessary, negative control antigen in the same dilution.

11.6.1.3 Preset complement solution as determined by preliminary complement testing according to 11.4 for the relevant antigen in use.

11.6.1.4 Hemolytic system according to 11.1 to 11.3.

11.6.2 Analysis

Microtiter plates shall be labelled in such a way that the antigen (or the negative control antigen), the sample (laboratory number), and the controls according to 11.7 may be identified at any time. If several antigens are used simultaneously in the main test, a different plate should be used for each antigen to prevent confusion.

An outline of the procedure for a sample and an antigen is shown in table A.5 as an example.

The sample dilution in the different wells of the plate results from the initial dilution of 1:5. With certain antigens (e.g. TBE virus/tick-borne encephalitis virus, LCM virus/lymphocytic choriomeningitis virus) an initial dilution of 1:2.5 is necessary.

Samples of cerebrospinal fluid should usually be employed undiluted.

If comparative titer determinations are carried out on consecutive samples from the same patient (test for change in titer), they should be tested by the same procedure to minimise effects through variations in different tests.