Reagenzien der Komplementbindungsreaktion (KBR)
Complement Fixation Test (CFT) Reagents

Gebrauchsanweisung
Instructions

Gebrauchsanweisung

Laut Beschluss der Deutschen Akkreditierungsstelle wird die KBR nur als zusätzliche Untersuchung bei positiven Ergebnissen, die mit sensitiveren und spezifischeren Verfahren erzielt wurden, empfohlen.

1. Anwendungsbereich

Reagenzien zur Anwendung durch Fachpersonal für die *in vitro* Bestimmung von komplementbindenden Antikörpern gegen verschiedene Krankheitserreger in Serum. In einigen Rechtsgebieten, und abhängig von den nationalen regulatorischen Anforderungen, wird die Verwendung der KBR unter gewissen Umständen nicht mehr als die Methode der Wahl für bestimmte Parameter angesehen. Bitte informieren Sie sich vor dem Gebrauch in aktuell geltenden Richtlinien, Akkreditierungsbestimmungen oder Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik über empfohlene Einsatzgebiete der Methode.

2. Einleitung

Komplement bezeichnet ein System von funktionell gekoppelten Serumproteinen, die für mehrere wichtige Funktionen bei der Infektabwehr verantwortlich sind. Komplement bindet an Antigen-Antikörperkomplexe. Dies führt zur Aktivierung der Komplementkaskade, wobei vorhandenes Komplement verbraucht wird. Im Fall von zellulären Antigenen erfolgt eine komplementinduzierte Lyse der mit Antikörpern beladenen Zellen. Dieser Mechanismus wird bei der Komplementbindungsreaktion (KBR) als Indikatorsystem benutzt. Eine spezifische Aktivierung erfolgt nur unter Beteiligung der Immunglobulinklassen IgG_1, IgG_2, IgG_3 und IgM, wobei letztere besonders effektiv sind. Hohe KBR Titer können als Hinweis auf akute Infektionen (Primärinfektion, Reinfektion oder Reaktivierung) gewertet werden.

3. Methode

Die KBR wird als Mikromethode nach der KOLMER-Technik (Kältebindung bei 2–8 °C über Nacht) entsprechend DIN 58 969 und nach den Richtlinien der WHO durchgeführt.

4. Testprinzip

Die Durchführung der KBR erfolgt in einer Mikrotiterplatte. Zum Testserum wird ein spezifisches Antigen gegeben. Enthält das Serum Antigen-spezifische Antikörper, bilden sich Immunkomplexe aus. Zugeführtes Komplement wird von diesen Immunkomplexen aktiviert und dabei verbraucht. Enthält das Testserum dagegen keine Antikörper, bilden sich keine Immunkomplexe aus. Das Komplement im Testansatz bleibt erhalten. Für die Nachweisreaktion wird das so genannte Hämolytische System eingesetzt. Es besteht aus sensibilisierten (d.h. mit Antikörpern beladenen) Erythrozyten. Wurde das Komplement im Testansatz verbraucht, weil Immunkomplexe gebildet wurden, bleiben die Erythrozyten intakt. Liegt das Komplement dagegen unverbraucht vor, weil das Patientenserum keine Antikörper enthält, kommt es zur Lyse der Erythrozyten. Die unlysierten Erythrozyten sedimentieren und bilden so genannte Knöpfchen am Boden der U-förmigen Kavitäten. Ein Zentrifugationsschritt beschleunigt die Sedimentation und verbessert die Knöpfchenbildung. Eine Titerbestimmung wird durch serielle Verdünnung der Patientenseren ermöglicht.

5. Reagenzien

Vorbereitung für Ansatz, Lagerung und Haltbarkeit.

Bitte achten Sie auf die Bedeutung der Symbole auf den Etiketten!

5.1 Antigen / Kontrollantigen

Bestellnummer siehe Produktliste	lyophilisiert; rekonstituieren in Aqua dest. gemäß der Angabe auf dem Etikett; Konservierungsmittel: 0,01 % Thiomersal; Gebrauchsverdünnung: **Verdünnung gemäß der Angabe auf dem Etikett** in KBR Puffer herstellen (z.B. 1:4); **Es wird empfohlen die Gebrauchsverdünnung immer frisch anzusetzen!**
Lagerung und Haltbarkeit: als Lyophilisat bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett); gelöst in 1 ml Aqua dest. bei 2–8 °C: 1 Woche; in Portionen (als Stammlösung) bei –20 °C: 2 Monate	

Antigene, die aus infizierten Zellen isoliert werden, enthalten Bestandteile aus der Wirtszelle. Dies kann bei vereinzelten Seren durch vorhandene Antikörper gegen solche Bestandteile zu falsch positiven Ergebnissen führen. Zur Erkennung dieser unspezifischen Reaktionen werden Kontrollantigene eingesetzt. Es handelt sich hier um entsprechend zur Antigenherstellung aufgearbeitetes, nicht infiziertes Zellmaterial der jeweiligen Zelllinie. Das Kontrollantigen wird analog zum Antigen in der KBR eingesetzt. Es wird ausdrücklich empfohlen, das Kontrollantigen, sofern dieses vorhanden ist, mitzuführen, um unspezifische Reaktionen der Patientenproben auszuschließen. Eine Auswertung ist nur dann möglich, wenn beide Ansätze parallel zum gleichen Zeitpunkt erfolgen.

5.2 Positive und negative Kontrollseren

Bestellnummer siehe Produktliste	lyophilisiert; in 0,1 ml Aqua dest. rekonstituieren; Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid; Gebrauchsverdünnung: **1:10 Verdünnung in KBR Puffer herstellen;** 30 Min. bei 56 °C im Wasserbad inaktivieren. **Es wird empfohlen die Gebrauchsverdünnung immer frisch anzusetzen!**
Lagerung und Haltbarkeit: als Lyophilisat bei 2–8 °C: bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett); gelöst in 0,1 ml Aqua dest. bei 2–8 °C: 2 Monate; in Gebrauchsverdünnung: 1 Woche (vor jeder Untersuchung nochmalig für 10 Min. bei 56 °C inaktivieren)	

CE 0197

1331 | 1130 | 1122

CE

1111 | 1112 | 1113 | 1114 | 1115
1116 | 1117 | 1118 | 1121 | 1123
1124 | 1125 | 1126 | 1127 | 1132
1154 | 1172 | 1173 | 1174 | 1175
1176 | 1177 | 1178 | 1180 | 1190
1191 | 1192 | 1193 | 1201 | 1203
1206 | 1207 | 1209 | 1224 | 1227
1234 | 1253 | 1297 | 9060 | 9070
9080 | 9090 | 9100 | 9110 | 9120

Hersteller / Manufacturer

virion\serion

Institut Virion\Serion GmbH
Friedrich-Bergius-Ring 19 | D-97076 Würzburg, Germany
Tel. +49 (0)931 30 45 0 | Fax +49 (0)931 30 45 100
E-Mail dialog@virion-serion.de | Internet www.virion-serion.de

5.3 Komplement

Bestellnummern 9001 1 x 1 ml 9001.5 5 x 1 ml	lyophilisiert; in 1 ml Aqua dest. rekonstituieren, stabilisiert in Borsäure; Gebrauchsverdünnung: Bei Verwendung der 1 % Erythrozyten Suspension zur Herstellung des Hämolytischen Systems: Komplementverdünnung siehe Angaben auf dem Etikett. Bei Verwendung des gebrauchsfertigen Hämolytischen Systems: Komplementverdünnung z.B. 1:40 in KBR Puffer.
Lagerung und Haltbarkeit: als Lyophilisat bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett); gelöst in 1 ml Aqua dest. bei 2–8 °C: 4 Wochen; **Gebrauchsverdünnung immer frisch ansetzen!**	

5.4 Ambozeptor

Bestellnummer 9002 2 ml	Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid; Gebrauchsverdünnung: siehe Angaben auf dem Etikett
Lagerung und Haltbarkeit: bei 2–8 °C unverdünnt bis zum Verfallsdatum (Etikett) **Gebrauchsverdünnung immer frisch ansetzen!**	

5.5 KBR Puffer (CFTB)

Bestellnummer 9009 1 x 2 Liter	Inhalt eines Fläschchens (Pulver) in 2 Liter Aqua dest. auflösen; pH 7,3 +/–0,1 (Empfehlung: pH-Wert prüfen); nach Auflösung des Pulvers gebrauchsfertig
Lagerung und Haltbarkeit: als Pulver bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett), aufgelöst bei 2–8 °C: 12 Wochen (um Kontaminationen zu vermeiden sollte der Puffer in Aliquots gelagert werden)	

5.6 Erythrozyten

zu beziehen bei Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen

50 % Vollblut-Suspension in Alsever-Puffer (Hammel-Erythrozyten)

1%ige Hammel-Erythrozyten Suspension

5.7 Gebrauchsfertiges Hämolytisches System

zu beziehen bei Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen

6. Probenmaterial

Serum (Kein Plasma verwenden! Bei Verwendung von Citrat- oder EDTA-Plasma wird die Konzentration an wichtigen Ionen für die KBR reduziert.)

7. Zusätzliche benötigte Materialien

Übliche Laborausrüstung (Pipetten, Labortimer, pH-Messsystem, Glasgefäße); U-Form Mikrotiterplatten; Abdeckung für Mikrotiterplatten (Deckel oder weitere Mikrotiterplatte); Inkubator (4 °C und 37 °C); Wasserbad (37 °C und 56 °C); Aqua dest.; Glasröhrchen für Serumaktivierung (100 x 11/12 mm); Plastikröhrchen für Antigen und Kontrollantigen Verdünnung (100 x 16 mm, Polystyrol); Zentrifugenröhrchen (z.B. 50 mL Falcon-Röhrchen); wird nur bei Verwendung der 50%igen Erythrozytenlösung benötigt

8. Vorversuche

Alle Reagenzien der Institut Virion\Serion GmbH sowie Hammel-Erythrozytenlösungen und gebrauchsfertiges Hämolytisches System von Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH sind normiert, so dass Vorversuche zur Einstellung von Ambozeptor und Komplement entfallen.
Die Komponenten Komplement, Hämolytischer Ambozeptor und KBR-Puffer sind austauschbar und können nach Validierung in Vorversuchen auch von anderen Herstellern bezogen werden.

9. Vorbereitung von Proben und Reagenzien

9.1 Probenvorbereitung und Lagerung

- Patientenseren, sowie positive und negative Kontrollseren im Glasröhrchen 1:10 mit KBR-Puffer (CFTB) verdünnen (z.B. 0,1 ml Patientenserum + 0,9 ml KBR-Puffer)
- 30 Min. bei 56 °C im Wasserbad inkubieren (Inaktivierung des endogenen Komplements)

Verdünnte Seren können gut verschlossen für eine Woche bei 2–8 °C gelagert werden. Vor jeder Untersuchung müssen die Proben erneut 10 Min. bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert werden.

9.2 Vorbehandlung von Seren mit Eigenhemmung

Unter dem Begriff Eigenhemmung werden antikomplementäre Serumeigenschaften zusammengefasst, die zur Hämolysehemmung unterschiedlicher Ausprägung führen. Zur Detektion der Eigenhemmung wird die sogenannte Serumkontrolle (Ansatz ohne Antigen) im Testansatz mitgeführt. Eigenhemmung kann durch zirkulierende Immunkomplexe, Rheumafaktoren und Medikamente (Dextrane) bedingt sein oder wird bei hämolytischen bzw. kontaminierten Seren sowie nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Seren beobachtet. Nach Vorbehandlung mit unverdünntem Komplement können diese Seren in der KBR getestet werden.

Zur Vorbehandlung wird das Serum 1+1 mit Komplement verdünnt, z.B. 100 µl Serum (unverdünnt) + 100 µl Komplement (unverdünnt). Der Ansatz wird für 30 Min. bei 37 °C (Wasserbad) oder 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 800 µl KBR-Puffer (CFTB) wird das Serum auf eine Endverdünnung von 1:10 eingestellt. Nach einer Inkubation für 30 Min. bei 56 °C kann das Serum in der KBR eingesetzt werden. Die Interpretation von Ergebnissen dieser Seren sollte unter Vorbehalt geschehen, da die Vorbehandlung zu einer Beeinträchtigung des Ergebnisses führen kann.

Bleibt die Eigenhemmung trotz Vorbehandlung bestehen, muss eine erneute Serumabnahme erfolgen. Patienten, deren Seren wiederholt Eigenhemmung aufweisen, sollten auf das Vorliegen eines pathologischen Befunds (z.B. Autoimmunerkrankungen, Para-proteinämien) untersucht werden.

10. Durchführung KBR

10.1 TAG 1

Mikrotiterplatten beschriften und Protokollblatt anlegen. Pro Antigen möglichst eine separate Mikrotiterplatte benutzen (geringfügig variable Hämolyse-Zeiten der verschiedenen Antigene). Wird das Mitführen eines Kontrollantigens notwendig, muss das Serum in zwei parallelen Ansätzen (Antigen und Kontrollantigen) untersucht werden. Für jedes Antigen müssen ein positives und ein negatives Kontrollserum sowie eine Komplementkontrolle mitgeführt werden!

Beispiel Bestückung der Mikroplatte

	Ansatz mit Antigen						Ansatz mit Kontrollantigen					
Titer	SK*	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	SK*	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Kavitäten-Nr.	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Pos.-Kontrolle												
Neg.-Kontrolle												
Patient 1												
Patient 2												
Patient 3												
usw.												
Komplem.-Kontr.		2	1	0,5	0,25			2	1	0,5	0,25	

2; 1; 0,5; 0,25 = Komplementeinheiten der Komplementkontrolle
* SK = Serumkontrolle (Ansatz ohne Antigen)

Ansatz für jedes Patientenserum bzw. Kontrollserum

- Puffervorlage: 25 µl KBR-Puffer (CFTB) in die Kavitäten 1, sowie 3 bis 6 (oder weiter) in einer Reihe pipettieren
- 25 µl Serumverdünnung (1:10, Patienten- bzw. Kontrollenseren) in die Kavitäten 1, 2 und 3 pipettieren
- jeweils 25 µl Serumverdünnung ab Kavität 3 weiter titrieren, aus der letzten Kavität 25 µl verwerfen; es entsteht eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:160 (oder höher)
- 25 µl der Antigen- bzw. Kontrollantigen-Gebrauchsverdünnung in die Kavitäten 2 bis 6 (oder weiter) pipettieren; Kavität 1 enthält die Serumkontrolle (zur Überprüfung von Eigenhemmungen), in dieser Kavität entfällt die Zugabe von Antigen
- 25 µl der Komplement-Gebrauchsverdünnung in die Kavitäten 1 bis 6 (oder weiter) pipettieren

Ansatz der Komplementkontrolle

- 25 µl KBR Puffer (CFTB) in die Kavitäten Nr. 3, 4 und 5 in einer Reihe pipettieren
- 25 µl Komplement-Gebrauchsverdünnung in die Kavitäten 2 und 3 pipettieren jeweils 25 µl Komplementverdünnung ab Kavität 3 weiter titrieren, aus der 5. Kavität 25 µl verwerfen; es entsteht eine Verdünnungsreihe mit 2, 1, 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten
- 25 µl KBR-Puffer und 25 µl Antigen bzw. Kontrollantigen in die Kavitäten 2 bis 5 pipettieren; Mikrotiterplatte abdecken und für 16–20 Std. bei 2–8 °C inkubieren

10.2 TAG 2

Vorbereitung des Hämolytischen Systems

Ambozeptor-Gebrauchsverdünnung und 1%ige Erythrozyten-Suspension (vorher sind die sedimentierten Erythrozyten durch vorsichtiges Schütteln wieder in Suspension zu bringen) zu gleichen Teilen mischen und zur Sensibilisierung für 30 Min. bei 37 °C im Wasserbad inkubieren. Alternativ kann ein gebrauchsfertiges Hämolytisches System verwendet werden (siehe 4.7). Hierzu benötigte Menge entnehmen und für 15 Min. bei 37 °C im Wasserbad erwärmen.

Mikrotestplatten mit Ansatz vom Tag 1

- Mikrotiterplatten mit Ansätzen von Tag 1 für 30 Min. bei 37 °C im Brutschrank erwärmen (Platten abdecken und möglichst einzeln inkubieren; max. vier Platten stapeln); Hämolytisches System zeitgleich im Wasserbad vorwärmen
- 50 µl frisch vorbereitetes Hämolytisches System in alle verwendeten Kavitäten pipettieren; Platten schütteln
- Inkubation für 15–30 Min. bei 37 °C im Brutschrank (Platten einzeln platzieren; max. 4 Platten stapeln); nach 15 Min. Hämolysekontrolle überprüfen, vorher nochmals schütteln
- Wenn die Komplementkontrolle in den Kavitäten mit 2 und 1 Komplementeinheit/en eine komplette Hämolyse zeigt, wird die Inkubation beendet.
- Zentrifugation der Mikrotiterplatten bei 700 x g für 5 Min.; die Ablesung sollte innerhalb 30–60 Min. erfolgen.

Falls keine Zentrifuge zur Verfügung steht, kann die Ablesung innerhalb von 30 bis maximal 60 Min. direkt erfolgen. Die Knöpfchenbildung ist in diesem Fall weniger deutlich ausgeprägt.

Bei Einsatz des gebrauchsfertigen Hämolytischen Systems ist eine um ca. Faktor 1,4 höhere Komplementkonzentration erforderlich, so dass sich z.B. statt einer 1:55 eine 1:40 Verdünnung ergibt.

- das Hämolytische System vorsichtig schütteln und die für den Test benötigte Menge entnehmen
- das Hämolytische System für 30 Min. bei 37 °C inkubieren / Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgt gleichzeitig bei 37 °C im Brutschrank
- je 50 µl pro Kavität zum Test pipettieren und mit dem Testansatz wie oben beschrieben fortfahren
- die Auswertung erfolgt wie oben beschrieben
- Lysezeiten können um bis zu 10 Min. verlängert sein

Auswertung / Ablesen

100% ige	Hämolyse-Hemmung mit	4 = positiv
75% ige	Hämolyse-Hemmung mit	3 = positiv
50% ige	Hämolyse-Hemmung mit	2 = negativ
25% ige	Hämolyse-Hemmung mit	1 = negativ
	Spuren von Hämolyse-Hemmung mit	+/– = negativ
	eine komplette Hämolyse mit	0 = negativ

Als positiv werden Ergebnisse mit den Bewertungen 3 und 4 eingestuft. Hämolyse-Hemmungen von weniger als 75 % sind als negativ zu beurteilen.

Testgültigkeitskriterien

- Die Negativkontrolle muss ein negatives Ergebnis erzielen (Titer < 1:10).
- Die Positivkontrolle muss den auf dem Etikett angegebenen Titer (+/–1 Titerstufe) erreichen.
- Die Serumkontrolle darf keine Hämolyse-Hemmung aufweisen (eine Hämolyse-Hemmung ist ein Hinweis auf Eigenhemmung des Serums).
- Die Komplementkontrolle muss in den Kavitäten mit 2 und 1 Komplementeinheit/en eine 100%ige Hämolyse aufweisen; bei 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten darf keine Hämolyse stattgefunden haben

11. Schutzmaßnahmen und Entsorgung

Für die Handhabung der Testreagenzien und der Patientenproben gelten die anerkannten Laborregeln:

- Das Komplement ist aufgrund des biologischen Ursprungs als potentiell infektiös zu betrachten, weshalb der Umgang unter Einhaltung der bei Biogefährdung empfohlenen Sicherheitsvorkehrungen erfolgen muss. Es wird empfohlen potentiell infektiöse Materialien vor der Entsorgung zu sterilisieren.
- Antigene und Kontrollantigene werden nach anerkannten Methoden inaktiviert. Alle humanen Kontrollseren sind negativ auf HBs-Ag-, anti-HCV- sowie anti-HIV-Antikörper getestet.
- Antigene und Kontrollantigene sowie Patienten- und Kontrollseren müssen dennoch als potentiell infektiös betrachtet werden. Daher sollte der Umgang mit diesen Materialien unter Einhaltung der bei Biogefährdung empfohlenen Sicherheitsvorkehrungen erfolgen. Es wird empfohlen potentiell infektiöse Materialien vor der Entsorgung zu sterilisieren.
- In Bereichen, in denen mit Testreagenzien oder mit Patientenproben gearbeitet wird, darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Beim Umgang mit Testreagenzien und Patientenproben ist der direkte Kontakt durch das Tragen von Laborkitteln, Einweghandschuhen und Schutzbrillen zu vermeiden.

Zur Entsorgung beachten Sie bitte die jeweils geltenden gesetzlichen Vorschriften.

12. Leistungsmerkmale – zu erwartende Werte

Mit Hilfe der KBR können komplementbindende Antikörper der Klassen IgG_1, IgG_2, IgG_3 und IgM nachgewiesen werden.

Wegen der fehlenden Differenzierung der Antikörperklassen sollten zur sicheren Befundinterpretation zwei Serumproben, die im Abstand von ein bis zwei Wochen gewonnen wurden, untersucht werden. Bestimmungen aus nur einer Probe erlauben keine zuverlässige Aussage über eventuelle Infektionen oder deren Stadium.

Ein mindestens 4-facher Titeranstieg in zwei aufeinanderfolgenden, parallel untersuchten Serumproben gilt als beweisend für eine akute Infektion. In beiden Serumproben gleichmäßig erhöhte KBR-Titer lassen auf eine kurz zurückliegende oder noch anhaltende Infektion schließen. Die Differenzierung zwischen diesen beiden Infektionsstadien erfordert zusätzliche Diagnoseverfahren (IgM- und IgG-spezifische Nachweissysteme). Ein signifikanter Titerabfall in zwei aufeinanderfolgenden Serumproben zeigt eine abgelaufene Infektion im Rekonvaleszenzstadium an.

Somit kann die KBR als Suchtest für akute Infektionen verwendet werden. Zur Bestimmung der Immunitätslage (Serumnarbe, Immunschutz) ist die KBR nicht geeignet.

Im Gegensatz zu anderen Verfahren ermöglicht die KBR die Diagnose von Reinfektionen und endogenen Reaktivierungen trotz Abwesenheit einer IgM-Antikörpersynthese.

Negative KBR-Ergebnisse schließen einen akuten Infekt nicht aus. Dies gilt insbesondere dann, wenn es sich um Frühstadien von Infektionen, lokalisierte Infektionen (z.B. mit Gonorrhoe, Mykoplasmen, Chlamydien, Herpes-Simplex) oder um Infektionen bei immunsupprimierten Patienten (z.B. AIDS, Transplantatempfänger) handelt. In solchen Fällen sollten ergänzende Nachweissysteme (z.B. PCR, Erregerisolierung, etc.) eingesetzt werden.

13. Erreger / Kreuzreaktivitäten

Adenovirus: keine bekannt *(Virology, Fields 5th Edition)*
Brucella: möglicherweise Yersinia enterocolitica 09, Francisella tularensis, Coxiella burnetii, Vibrio colerae *(Bundle et al., 1984; Araj et al 1988; Corbel et al., 1997)*
Campylobacter fetus/ssp., Campylobacter jejuni: möglicherweise Legionella, Salmonella, Chlamydia, Enterobacteria *(Schmitt-Otto et al., 2006)*
Chlamydia: möglicherweise LPS von gram-negativen Bakterien wie Mycoplasma, einige Enterobacteria, Salmonella und E. coli *(Haralambieva et al., 2002; Haralambieva et al., 2001; Mitov et al., 2003; Burkhardt et al., 2003)*
Cytomegalovirus: möglicherweise andere Herpesviren wie Herpes Simplex Virus (HSV-1, HSV-2), Epstein-Barr Virus (EBV) *(Balachandran et al., 1987; Sakulwira et al., 2002)*
Coxiella burnetii Phase I: Legionella micdadei, Bartonella quintana, Bartonella henselae *(Musso et al., 1997)*
Coxiella burnetii Phase II: Legionella micdadei, Bartonella quintana, Bartonella henselae, M. pneumoniae, B. pertussis *(Musso et al., 1997; Devine et al., 1997)*
Coxsackievirus: möglicherweise Enterovirus, Echovirus und Hepatitis A Virus, Epstein-Barr Virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Rhinovirus, Mycoplasma *(Samuelson et al., 1993; Reigel et al., 1985; Samuelson et al., 1990; Mertens, 2004)*
Epstein-Barr Virus: möglicherweise Herpesviren (v.a. CMV, polyklonale Stimulation) und Toxoplasma gondii *(Aalto et al., 1998)*
Echovirus: siehe Coxsackievirus
FSME Virus: möglicherweise andere Flaviviren: Dengue Virus, Hepatitis C Virus, Gelbfieber Virus, Japanese Encephalitis Virus, West Nile Virus, FSME Virus (Litzba et al., 2014)
Herpes Simplex Virus 1/2: möglicherweise andere Mitglieder der Herpesviridae Familie *(Balachandran et al., 1987)*
Influenza A Virus: Influenza B Virus in Einzelfällen nach Impfungen *(Cox et al., 2004)*
Influenza B Virus: Influenza A Virus in Einzelfällen nach Impfungen *(Cox et al., 2004)*
Legionella pneumophila: möglicherweise andere Serogruppen, Campylobacter jejuni, Rickettsiae, Gram-negative Bakterien *(Cheesbrough et al., 1992; Neumeister 1996; Harrison et al., 1989)*
Leptospira biflexacanicola/grippotyphosa/icterohaemorrhagiae/pomona/sejroe: keine bekannt; differentialdiagnostisch sollten folgende Erkrankungen in Betracht gezogen werden: Dengue-Fieber, Q-Fieber, Malaria, Pulmonale Tuberkulose, Virus-Hepatitis, bakterielle oder virale Meningitis, Influenza, Brucellose, Ehrlichiose, Tularämie, HIV, Sepsis, Gelbfieber, Adenovirus-Infektionen, Gastroenteritis, atypische Pneumonie *(http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf)*
Listeria monocytogenes: möglicherweise andere Gram-positive Bakterien *(Hudak et al., 1984; Golizadeh et al., 1996)*
Masern Virus: möglicherweise andere Paramyxoviren *(Mertens 2004)*
Mumps Virus: möglicherweise andere Paramyxoviren *(Linde et al., 1987; Backhouse et al., 2006)*
Mycoplasma pneumoniae: möglicherweise andere Gram-negative Bakterien *(Tuuminen et al., 2000)*
Neisseria gonorrhoeae: Meningokokken, Neisseria meningitidis, Neisseria lactamica, Neisseria cinerea und Kingella denitrificans *(Freundlich et al., 1982; Ng et al., 2005)*
Parainfluenza Virus: möglicherweise Mumps Virus *(Hendrickson et al., 2003)*
Picorna Virus: siehe Coxsackievirus
Poliovirus: siehe Coxsackievirus
Respiratorisches Syncytial-Virus: keine bekannt *(Virology, Fields 5th Edition; Hendry et al., 1982)*
Rotavirus: keine bekannt *(Mertens 2004)*
Toxoplasma gondii: möglicherweise Neospora caninum und Sarcocystis hirsuta *(Nam et al., 1998; Kalita et al., 2015)*
Varizella-Zoster-Virus: möglicherweise andere Herpesviren *(Creadock-Watson et al., 1979)*
Yersinia enterocolitica 03/enterocolitica 09/pseudotuberculosis: möglicherweise Enterobacter, Brucella und Rickettsia *(Bottone et al., 1997)*

Instructions

According to a resolution by the German Accreditation Body, the CFT is only recommended as a confirmatory test in cases of samples evaluated positive using assays with higher specificity and sensitivity.

1. Intended use

Reagents for *in vitro* detection of antibodies, in serum, and by trained personnel, specific to a range of pathogens. In some jurisdictions, and dependent upon local regulatory requirements, the use of the CFT test in particular circumstances may not be recommended as the method of choice for certain parameters. We recommend to check the circumstances which apply to your locality with respect to regulations, accreditation requirements and quality standards with respect to laboratory based diagnosis and infectious diseases.

2. Introduction

Complement is a system of serum proteins, with linked functions, that are responsible for several important infection defense functions. Complement binds to antigen-antibody complexes resulting in "fixation" and activation of the complement cascade. In the activated, or "fixed", form Complement induces Complement-mediated lysis of the target structure. This mechanism is used in the CFT as an indicator for the presence of specific antibodies.

Complement is activated in the presence of IgG_1-, IgG_2-, IgG_3- and IgM-antigen-complexes, whereby the last is particularly effective. High CFT titers can indicate acute infections (primary infection, reinfection or reactivation).

3. Method

The CFT is performed as a micromethod according to the Kolmer technique (fixation at 2–8 °C, over night) and according to DIN 58 969 and WHO guidelines.

4. Test Principle

The CFT is performed in a microtitre plate. A pathogen-specific antigen is mixed with the test serum. In the presence of specific antibodies, immune complexes form. Added Complement is activated by these immune complexes and, due to it's labile nature, inactivated during the subsequent incubation step. In the absence of specific antibodies immune complexes are not formed and consequently the Complement components remain in their non-fixed state.

In order to detect the presence of specific immune complexes a hemolytic system (HS) consisting of antibody-coated erythrocytes is added. If the complement has been fixed by antigen-antibody complexes in the serum, the erythrocytes will remain intact as Complement is no longer available to react with the HS [Ab–Ag] (inhibition of hemolysis). In contrast, the erythrocytes will be lysed if Complement is accessible. After centrifugation, unlysed erythrocytes form a button on the bottom of the U shaped wells of the microtiter plate. To improve button formation sedimentation should be supported by centrifugation. Titer determination is enabled by serial dilution of the patient´s serum.

5. Reagents

Preparation of reagents for test run, storage and stability.

Please pay attention to the precise meaning of the symbols on the labels!

5.1 Antigen / Control Antigen

order number see product list	lyophilized, reconstitute with distilled water as indicated on the label; preservative: 0.01 % thiomersal; working dilution: **dilute** in CFT buffer **as indicated on the label** (e.g. 1:4); **it is recommended to use freshly prepared working dilution!**
storage and stability: lyophilized at 2–8 °C until expiry date (see label); dissolved in 1 ml distilled water at 2–8 °C: 1 week; frozen in small portions (as stock solution) at –20 °C: 2 months	

Antigens produced using infected cell cultures may contain host cell components. Some sera may have antibodies directed against such cell residues. If such antibodies are present, and are not compensated for, false positive results can be obtained. For detection of these non-specific reactions control antigens are used. Control antigens are derived from uninfected cell material of the corresponding host cells which are prepared similarly to the antigen. So far as the control antigens are available, it is strongly recommended to utilize them, in parallel with the specific antigen, in each test run. An evaluation is only possible when both preparations are tested in parallel at the same time.

5.2 Positive and Negative Control Sera

order number see product list	lyophilized, reconstitute in 0.1 ml distilled water; preservative: < 0.1 % sodium azide working dilution: 1:10 in CFT buffer; inactivate controls 30 min. at 56 °C in a water bath; **it is recommended to use freshly prepared working dilution!**
storage and stability: lyophilized at 2–8 °C until expiry date (see label); dissolved in 0.1 ml distilled water at 2–8 °C: 2 months; at working dilution: 1 week (before each test, inactivate sera again for 10 minutes at 56 °C)	

5.3 Complement

order number 9001 1 x 1 ml 9001.5 5 x 1 ml	lyophilized, reconstitute in 1 ml distilled water; preservative: boric acid; working dilution: using 1 % sheep erythrocytes for completion of the hemolytic system: Complement dilution: see label; using the ready-to-use hemolytic system: Complement dilution e.g. 1:40 in CFT buffer
storage and stability: lyophilized at 2–8 °C until expiry date (see label); dissolved in 1 ml distilled water at 2–8 °C: 4 weeks **Always prepare working dilution freshly!**	

5.4 Amboceptor

order number 9002 2 ml	preservative: <0.1 % sodium azide; working dilution: see label
storage and stability: undiluted at 2–8 °C: until expiry date (see label) **Always prepare working dilution freshly!**	

5.5 CFT buffer (CFTB)

order number 9009 1 x 2 Liter	dissolve content of 1 vial (powder) in 2 liter distilled water; pH 7.3 +/–0.1 (recommendation: check pH-value); ready-to-use after dissolution
storage and stability: as powder at 2–8 °C until expiry date (see label); dissolved at 2–8 °C: 12 weeks (to avoid contamination please store in aliquots)	

5.6 Erythrocytes

available from Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen, Germany

50 % whole blood suspension in Alsever's buffer (sheep erythrocytes)

1 % sheep erythrocytes

5.7 Ready-to-use Hemolytic System

available from Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen, Germany

6. Samples

Serum (Do not use plasma for CFT! When using citrate- or EDTA-plasma the concentration of necessary ions is reduced!)

7. Material required but not supplied

Common laboratory equipment (pipettes, timer, pH measuring system, glass vessels); microtiter plates with U-shaped bottom; cover for microtiter plates (lid or second microtiter plate); incubator (4 °C and 37 °C); water bath (37 °C and 56 °C); aqua dest.; glass tubes for serum inactivation (100 x 11/12 mm); plastic tubes for dilution of antigen und control antigen (100 x 16 mm, polystyrene); centrifugation tubes (e.g. 50 mL Falcon tubes) – only required when using the 50 % Sheep Erythrocyte suspension

8. Pretesting

Exclusive use of standardised SERION CFT reagents as well as erythrocytes and the ready-to-use hemolytic system from Labor Dr. Merk & Kollegen renders pretesting of Complement and Amboceptor unnecessary.
The components Complement, Haemolytic Amboceptor, and CFT buffer are exchangeable. After validation in pretestings components of other manufacturers can be used.

9. Preparation of samples and reagents

9.1 Sample Preparation and Storage

- dilute patients sera as well as positive and negative control sera in glass tubes 1:10 in CFT buffer (CFTB), (e.g. 0.1 ml patient's serum with 0.9 ml CFT buffer)
- incubate for 30 minutes at 56 °C in a water bath (inactivation of endogenous complement)

Diluted sera can be kept for a week at 2–8 °C if sealed well. Before each test, inactivate sera again for 10 minutes at 56 °C.

9.2 Procedure for sera with anticomplementary activity

Anticomplementary activity refers to the characteristics of some sera to inhibit hemolysis to varying degrees. To identify this property a serum control (test run without antigen) is included for each serum. Anticomplementary activity can be induced by immunoglobulin aggregation, rheumatoid factors or drugs (dextranes) and can often be found in hemolytic or contaminated sera and after repeated freezing and thawing. After pretreating with undiluted complement, to absorb this activity, the sera can then be analyzed in the CFT.

For pretreatment, dilute the serum 1 + 1 with complement (example: 100 µl of undiluted serum + 100 µl of undiluted complement). The reaction mixture has to be incubated for 30 minutes at 37 °C (in a water bath) or 60 minutes at room temperature. After addition of 800 µl CFT buffer (CFTB) the serum is diluted to an end concentration of 1:10. After incubation for 30 minutes at 56 °C the serum can be used in the CFT.

The interpretation of results from these sera should be treated with caution as this pretreatment may adversely influence the results.

If anticomplementary activity persists in pretreated sera, a new serum sample must be obtained. Patients whose sera repeatedly show anticomplementary activity should be examined for pathological states such as autoimmune disease, paraproteinemia, etc.

10. Test performance CFT

10.1 DAY 1

Prepare microtiter plates and generate a protocol sheet. If possible use one microtiter plate for each antigen analyzed (time of hemolysis may vary slightly from antigen to antigen). If the use of a control antigen is necessary, the serum must be analyzed in two parallel test runs (antigen and control antigen). For each antigen a positive and a negative control as well as a complement control must be included!

Example: microtiter plate with antigen and control antigen

	test run with antigen						test run with control antigen					
titer	SC*	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	SC*	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
well no.	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
pos.-control												
neg.-control												
patient 1												
patient 2												
patient 3												
etc.												
compl. control		2	1	0.5	0.25			2	1	0.5	0.25	

2; 1; 0.5; 0.25 = complement units of complement control
* SC = serum control (without antigen)

Test run for every patient serum or control
- add 25 µl CFT buffer (CFTB) into well 1, and wells 3 to 6 (or further) within one row
- pipette 25 µl diluted serum (1:10, patient or control sera) into well 1, 2 and 3
- titration of sera starting from well 3: titrate 25 µl serum dilution from each well into the next up to well 6. Discard 25 µl from the last well. The titration corresponds to a dilution series of 1:10 to 1:160 (or higher).
- pipette 25 µl each of antigen or control antigen-working dilution into wells 2 to 6 (or further); well 1 contains the serum control (for evaluation of anticomplementary activities), do not add antigen to this well
- pipette 25 µl of complement working dilution into well 1 to 6 (or further)

Test run for complement control
- pipette CFT buffer (CFTB) into wells 3, 4 and 5 in one row
- pipette 25 µl working dilution of complement in well 2 and 3
- starting from well 3: titrate 25 µl from each well into the next up to well 5. Discard 25 µl from well 5. This titration results in a dilution series of 2, 1, 0.5 and 0.25 complement units
- pipette 25 µl of each antigen (or control antigen) and CFT buffer (CFTB) in wells 2 to 5
- cover and incubate microtiter plate for 16 to 20 hours at 2–8 °C

10.2 DAY 2

Preparation of the hemolytic system
Mix sedimented erythrocytes carefully to generate a homogeneous suspension before starting. Prepare the hemolytic system by mixing equal amounts of the amboceptor working dilution with the 1 % erythrocyte suspension. Incubate the suspension for 30 minutes at 37 °C in a water bath.
Alternatively, employ the ready-to-use hemolytic system (see 4.7). Incubate the required amount of solution for 15 minutes at 37 °C in a water bath.

Microtiter plates from day 1
- prewarm the microtiter plates from the 1st day for 30 minutes at 37 °C in an incubator (cover plates; if possible, place plates separately; do not stack more than four plates); prewarm hemolytic system at the same time in a water bath;
- pipette 50 µl of the freshly prepared hemolytic system into each well, carefully shake microtiter plates to mix
- incubate microtiter plates in a 37 °C incubator for 15–30 minutes (cover plates; if possible, place microtiter plates separately; do not stack more than four plates); check hemolysis after 15 minutes, shake well previously
- the incubation is stopped when the Complement controls with 2 and 1 units show complete hemolysis and no hemolysis is detectable in the wells containing 0.5 and 0.25 complement units
- centrifuge plates for 5 minutes at 700 x g; reading is possible within the next 30 to 60 minutes after centrifugation (store at 2–8 °C)

If no centrifuge is available, reading can be performed within 30 minutes up to a maximum of 60 minutes. In this case the bottom formation at the bottom of the microtiter plate is less distinct.

If the ready-to-use hemolytic system is employed for SERION CFT a higher complement concentration (approx. factor 1.4) is necessary, which corresponds to e.g. a 1:40 dilution instead of e.g. a 1:55 dilution.
- mix the hemolytic system thoroughly
- incubate microtiter plates of day 1 in a 37 °C incubator for 15–30 minutes (cover plates; if possible, place microtiter plates separately; do not stack more than four plates); check hemolysis after 15 minutes, shake well previously
- pipette 50 µl of the ready-to-use hemolytic system into each well, carefully shake microtiter plates to mix
- lysis incubation times can be extended for up to 10 minutes

Reading

100 %	inhibition of hemolysis records a value of	4 = positive
75 %	inhibition of hemolysis records a value of	3 = positive
50 %	inhibition of hemolysis records a value of	2 = negative
25 %	inhibition of hemolysis records a value of	1 = negative
	traces of inhibition of hemolysis records a value of	+/– = negative
	complete hemolysis records a value of	0 = negative

Only values 3 and 4 are regarded as positive. Hemolysis inhibitions below 75 % have to be regarded as negative.

Criteria of validity
- The negative control must be negative (complete hemolysis; titer < 1:10).
- The positive control must show the predicted titer as indicated on the label (+/–1 titer).
- In the serum control hemolysis inhibition may not occur (hemolysis inhibition indicates anticomplementary activity).
- In the complement controls with 2 and 1 units complete hemolysis has to be achieved whereas no hemolysis should occur in the wells containing 0.5 and 0.25 complement units.

11. Statements of warning and disposal

All reagents and human specimens should be handled carefully, using established good laboratory practice.

- The Complement is of biological origin, and therefore it should be handled according to the safety instructions for biohazardous substances. It is recommended to sterilise potential infectious materials after the test run.
- Antigen and control antigens have been inactivated by established methods; all control sera of human origin have been tested and found to be negative for HBs-Ag-, HCV- and HIV-antibodies.
- Control sera, antigens, control antigens as well as patient's sera must be regarded as potentially infectious material. Thus, these materials should be handled according to the safety instructions for biohazardous substances. It is recommended to decontaminate potential infectious materials after the test run.
- Do not smoke, eat or drink in areas in which specimen or kit reagents are handled.
- Wear disposable gloves, laboratory coat and safety glasses while handling kit reagents or specimen. Wash hands thoroughly afterwards.

For disposal please follow the relevant statutory requirements!

12. Performance characteristics and expected values

The CFT allows detection of complement binding IgG_1, IgG_2, IgG_3 and IgM antibodies. Due to the lack of antibody class differentiation 2 serum samples taken between 1 and 2 weeks apart should be tested to assess the infection status. If only a single serum sample of a patient is analyzed, no reliable statement is possible about an infection or its status.

An at least 4-fold rise of titer in two consecutive sera that are analyzed in parallel serves as a proof for an acute infection. Elevated titers in both serum samples suggest an acute or recent infection. For discrimination between these infection stages, further diagnostic methods (IgM and IgG-specific detection systems) are required. A significant decrease in titer seen in consecutive sera is considered as an evidence of convalescence from a recent infection.

Consequently the CFT may be used as a screening test for acute infections. For immune status determination (protective titers, past infections) the CFT is not suitable.

In contrast to other diagnostic methods the CFT allows for the diagnosis of reinfections and endogenous reactivations in patients without IgM antibody synthesis.

Negative CFT titers do not definitely exclude an acute infection. This is possible with sera from patients with early infection stages, local infections (e.g. Gonorrhea, Mycoplasma, Chlamydia, Herpes-Simplex), or from immunosuppressed patients (e.g. transplant recipients, HIV positive patients). In such cases additional tests should be performed (e.g. PCR, isolation of the pathogen).

13. Pathogens / cross-reactivity

Adenovirus: no cross-reactions known *(Virology, Fields 5th Edition)*
Brucella: potentially Yersinia enterocolitica 09, Francisella tularensis, Coxiella burnetii, Vibrio colerae *(Bundle et al., 1984; Araj et al 1988; Corbel et al., 1997)*
Campylobacter fetus/ssp., Campylobacter jejuni: potentially Legionella, Salmonella, Chlamydia, Enterobacteria *(Schmitt-Otto et al., 2006)*
Chlamydia: potentially LPS of gram-negative bacteria such as Mycoplasma, several Enterobacteria, Salmonella and E. coli *(Haralambieva et al., 2002; Haralambieva et al., 2001; Mitov et al., 2003; Burkhardt et al., 2003)*
Cytomegalovirus: potentially other herpes viruses such as Herpes Simplex Virus (HSV-1, HSV-2), Epstein-Barr Virus (EBV) *(Balachandran et al., 1987; Sakulwira et al., 2002)*
Coxiella burnetii Phase I: Legionella micdadei, Bartonella quintana, Bartonella henselae *(Musso et al., 1997)*
Coxiella burnetii Phase II: Legionella micdadei, Bartonella quintana, Bartonella henselae, M. pneumoniae, B. pertussis *(Musso et al., 1997; Devine et al., 1997)*
Coxsackievirus: potentially Enterovirus, Echovirus and Hepatitis A Virus, Epstein-Barr Virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Rhinovirus, Mycoplasma *(Samuelson et al., 1993; Reigel et al., 1985; Samuelson et al., 1990; Mertens, 2004)*
Epstein-Barr Virus: potentially herpes viruses (mainly CMV, polyclonal stimulation) and Toxoplasma gondii *(Aalto et al., 1998)*
Echovirus: see Coxsackievirus
Herpes Simplex Virus 1/2: potentially other members of Herpesviridae family *(Balachandran et al., 1987)*
Influenza A Virus: Influenza B Virus in individual cases after vaccination *(Cox et al., 2004)*
Influenza B Virus: Influenza A Virus in individual cases after vaccination *(Cox et al., 2004)*
Legionella pneumophila: potentially other serogroups, Campylobacter jejuni, Rickettsiae, gram-negative bacteria *(Cheesbrough et al., 1992; Neumeister 1996; Harrison et al., 1989)*
Leptospira biflexacanicola/grippotyphosa/icterohaemorrhagiae/pomona/sejroe: no cross-reactions known; for differential diagnosis the following diseases should be taken into account: dengue fever, Q-fever, malaria, pulmonary tuberculosis, virus-hepatitis, bacterial or viral meningitis, influenza, brucellosis, ehrlichiosis, tularaemia, HIV, sepsis, yellow fever, adenoviral infections, gastroenteritis, atypical pneumonia. *(http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf)*
Listeria monocytogenes: potentially other gram-positive bacteria *(Hudak et al., 1984; Golizadeh et al., 1996)*
Measles Virus: potentially other paramyxoviruses *(Mertens 2004)*
Mumps Virus: potentially other paramyxoviruses *(Linde et al., 1987; Backhouse et al., 2006)*
Mycoplasma pneumoniae: potentially other gram-negative bacteria *(Tuuminen et al., 2000)*
Neisseria gonorrhoeae: meningococcus, Neisseria meningitidis, Neisseria lactamica, Neisseria cinerea and Kingella denitrificans *(Freundlich et al., 1982; Ng et al., 2005)*
Parainfluenza Virus: potentially mumps virus *(Hendrickson et al., 2003)*
Picorna Virus: see Coxsackievirus
Poliovirus: see Coxsackievirus
Respiratory Syncytial Virus: no cross-reactions known *(Virology, Fields 5th Edition; Hendry et al., 1982)*
Rotavirus: no cross-reactions known *(Mertens 2004)*
TBE Virus: potentially other Flaviviruses: Dengue Virus, Hepatitis C Virus, Yellow fever Virus, Japanese Encephalitis Virus, West Nile Virus, TBE Virus *(Litzba et al., 2014)*
Toxoplasma gondii: potentially Neospora caninum and Sarcocystis hirsuta *(Nam et al., 1998; Kalita et al., 2015)*
Varicella-Zoster Virus: potentially other herpes viruses *(Creadock-Watson et al., 1979)*
Yersinia enterocolitica 03/enterocolitica 09/pseudotuberculosis: potentially enterobacter, Brucella and Rickettsia *(Bottone et al., 1997)*

Literatur / Bibliography

Aalto et al., Immunoreactivation of Epstein-Barr Virus Due to Cytomegalovirus Primary Infection, 1998; Journal of Medical Virology. 56:186–191
Araj et al., ELISA vs routine tests in diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis, 1988; APMIS 96:171–176
Backhouse et al., Evaluation of Two Enzyme Immunoassays for detection of Immunoglobulin G Antibodies to Mumps Virus, 2006; Clin Vacc Imm. 13(7):764–767
Balachandran et al., Antigenic Cross-Reactions among Herpes Simplex Virus Types 1 and 2, Epstein-Barr Virus, and Cytomegalovirus, 1987; Journal of Virology. 61(4): 1125–1135
Bottone et al., Yersinia enterocolitica: The Charisma Continues, 1997; Clin mic rev. 10(2):257–276
Bundle et al., Serological Confirmation of Brucella abortus and Yersinia enterocolitica O:9 O-Antigens by Monoclonal Antibodies, 1984; Inf. Imm. 46(2):389–392
Burkhardt et al., Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie der Chlamydia – Pneumonie, 2003; Pneumologie. 57:449–458
Cheesbrough et al., False-positive legionella serology in campylobacter infection, 1992; The Lancet. 339(8790):429
Corbel et al., Brucellosis: an Overview, 1997; Em Inf Dis 3(2)
Cox et al., Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines, 2004; Scandinavian Journal of Immunology. 59, 1–15
Creadock-Watson et al., Specific immunoglobulin responses after varicella and herpes zoster, 1979; J. Hyg Camb. 82:319
Devine et al., Combined determination of Coxiella burnetii-specific immunoglobulin M (IgM) and IgA improves specificity in the diagnosis of acute Q Fever, 1997; Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4(3):384–386
Freundlich et al., Comparison of Methods for the Immunological Identification of Neisseria gonorrhoeae in Clinical Specimens Using Commercially-Obtained Reagents, American Society of Clin Pathologists, 1982; Am J Clin Pathol. 77(4):456–8
Gholizadeh et al., Serodiagnosis of Listeriosis Based upon Detection of Antibodies against Recombinant Truncated Forms of Listeriolysin O, 1996; J Clin Micro. 34(6):1391–1395
Haralambieva et al., Cross-reaction between the genus-specific lipopolysaccharide antigen of Chlamydia spp. and the lipopolysaccharides of Porphyromonas gingivalis, Escherichia coli O119 and Salmonella newington: implications for diagnosis, 2001; Diagn Microbiol Infect Dis. 41(3): 99–106
Haralambieva et al., Monoclonal antibody of IgG isotype against a cross-reactive lipopolysaccharide epitope of Chlamydia and salmonella Re chemotype enhances infectivity in L-929 fibroblast cells, 2002; FEMS Immunol Med Microbiol 33 (2): 71–6
Harrison et al., A Laboratory Manual for Legionella, 1989; John Wiley and Sons Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, p 65
Hendry et al., K. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Respiratory Syncytial Virus Infection: Development and Description, 1982; J Clin Mic. 16(2):324–328
Henrickson et al., Parainfluenza Virus, 2003; Clin. Microbiol. Rev. 16(2):242
Hudak et al., Comparison of three serological methods-enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation, and microagglutination- in the diagnosis of human perinatal Listeria monocytogenes infection, 1984; Clinical invest med. (7)4: 349–54
Kalita et al., Evaluation of serological cross-reactivity between Sarcocystis hirsuta (Sarcocystis bovifelis) and Toxoplasma gondii, 2015; Ind. J. Sci. Res. and Tech. 3(3):1–3
Linde et al., Immunoglobulin Class and Immunoglobulin G Subclass Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Compared with Microneutralization Assay for serodiagnosis of Mumps Infection and Determination of Immunity, 1987; J Clin Micro. 25(9):1653–1658
Litzba et al., Evaluation of Different Serological Diagnostic Methods for TBE Virus, Vector-borne and zoonotic Diseases, 2014; 14(1)
Mertens TH., Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten, 2004; 2. Auflage, ELSEVIER
Mitov et al., Cross-reactive monoclonal antibodies raised against the lipopolysaccharide antigen of Salmonella minnesota Re chemotype: diagnostic relevance, 2003; Diagn Microbiol Infect Dis. 45 (4): 225–31
Musso et al., Serological cross-reactions between coxiella burnetii and legionella micdadei, 1997; Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4(2):208–212
Nam et al., Antibody reaction of human anti-Toxoplasma gondii positive and negative sera with Neospora caninum antigens, 1998; The Korean Journal of Parasitology. 36(4): 269–275
Neumeister, Legionelleninfektionen- Epidemiologie, Diagnostik, Klinik und Pathogenese, 1996; Clin. Lab. 42, 715–729
Ng et al., The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae, 2005; Can J Infect Dis Med Microbiol. 16(1):15–25
Reigel et al., Cross-reactions of immunoglobulin M and G antibodies with enterovirus-specific viral structural proteins, 1985; J. Hyg., Camb. 95, 469–481
Sakulwira et al., Serological evidence of herpesvirus infection in gibbons, 2002; BMC Microbiol. 2:11
Samuelson et al., Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infection by ELISA, 1990; Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. 4, 395–406
Samuelson et al., Diagnosis of enteroviral meningitis with IgG-EIA using heat-treated virions and synthetic peptides as antigens, 1993; J. Med. Virol. 40:271-277
Schmitt-Otto et al., Improved Serological Diagnosis Stresses the Major Role of Campylobacter jejuni in Triggering Guillain-Barré Syndrome, 2006; Clin Vacc Imm 13(7):779–783
Tuuminen et al., Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae Immunoglobulin G and A Antibodies in a healthy Finnish Population as Analyzed by Quantitative Enzyme Immunoassays, 2000; Clin Diag Lab Imm. 7(5):734–738
Virology, Fields 5th Edition

Sensitivität/Spezifität Sensitivity/Specifity	Leistungsbewertung/ Performance Evaluation	
	Sens. [%]	Spez./Spec. [%]
Adenovirus	90	>99
Brucella	89	99
Campylobacter fetus/ssp.	8,7	92,3
Campylobacter jejuni	80	85
Chlamydia	>99	96,3
Coxiella burnetii Phase I Coxiella burnetii Phase I	93	97
Coxiella burnetii Phase II Coxiella burnetii Phase II	81	93
Coxsackievirus A9	45	93
Coxsackievirus B1	83	79
Coxsackievirus B2	63	60
Coxsackievirus B3	45	56
Coxsackievirus B4	58	56
Coxsackievirus B5	60	50
Coxsackievirus B6	66,7	68,8
Coxsackievirus Pool (A9, B1–B6)	63	82,4
Cytomegalovirus	>99	62,9
Echovirus Pool (4, 6, 9, 14, 24, 30)	85	67
Epstein-Barr Virus	81	83
FSME Virus / TBE Virus	75	>99
Herpes Simplex Virus 1/2	90	>99
Influenza A Virus	>99	74
Influenza B Virus	97	98
Influenza A/B Virus Pool	>99	81
Legionella pneumophila	63	>99
Leptospira biflexa Leptospira canicola Leptospira grippotyphosa Leptospira icterohaemorrhagiae Leptospira pomona Leptospira sejroe	83	82
Masernvirus / Measles Virus	75,5	>99
Mumpsvirus / Mumps Virus	63	92
Mycoplasma pneumoniae	64	98
Neisseria gonorrhoeae	45	53
Parainfluenza Virus 1	14	98
Parainfluenza Virus 2	89	99
Parainfluenza Virus 3	85	95
Parainfluenza Virus Pool (1, 2, 3)	33,3	90,5
Picorna Virus	81,3	83,3
Poliovirus	60	50
Respiratorisches Synzytial-Virus / Respiratory Syncytial Virus	88	>99
Rotavirus	>99	>99
Toxoplasma gondii	83,2	94,8
Varizella-Zoster-Virus / Varicella Zoster Virus	62	>99
Yersinia enterocolitica 03 Yersinia enterocolitica 09 Yersinia pseudotuberculosis	35	96

Sensitivitäten und Spezifitäten wurden gegen Referenztests (z.B. ELISA) oder klinische Befundungen ermittelt.
Zur Bestimmung der Präzision wurden vorbewertete Seren mit verschiedenen Anti-körperaktivitäten (Titern) im 3-fach Ansatz analysiert. Dabei wurde stets der Zielwert mit einer Präzision von +/–1 Titerstufe erreicht.
Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden vorbewertete Seren mit verschiedenen Antikörperaktivitäten (Titern) mit SERION KBR Antigenen unterschiedlicher Chargen analysiert. Dabei wurde stets der Zielwert mit einer Präzision von +/–1 Titerstufe erreicht.
Nachweisgrenze: Die untere Nachweisgrenze der KBR wird durch eine 75%ige Hämolysehemmung charakterisiert.
Störfaktoren: Lipämische, hämolytische sowie ikterische Proben sollten nur unter Vorbehalt eingesetzt werden. Anhand ausgewählter Tests konnte gezeigt werden, dass Triglyceride (bis zu 11,5 g/L), Hämoglobin (bis zu 2 g/L) und Bilirubin (bis zu 0,201 g/L) keine Veränderung des Probentiters um mehr als +/–1 Titerstufe induzierten.

Sensitivities and specificities were determined in comparison to reference assays (e.g. ELISA) or clinical pre-evaluations.
The precision is determined using sera with a range of predetermined antibody activities (titers) which are tested in triplicates. So is a target value with a precision of +/–1 titer step ensured.
The reproducibility is determined using sera with a range of predetermined antibody activities (titers) which are analysed against different SERION CFT antigen charges. So is a target value with a precision of +/–1 titer step ensured.
Limit of detection: The limit of detection is characterized by a 75% inhibition of hemolysis. Interfering substances: Lipaemic, hemolytic or icteric samples should only be tested with caution. In analyses with selected assays Triglycerides (up to 11.5 g/L), Haemoglobin (up to 2 g/L), and Bilirubin (up to 0.201 g/L) did not induce a titer change exceeding +/–1 titer step.

Symbole auf den Etiketten / Symbols on labels

LOT	Charge / Lot
REF	Referenz oder Bestellnummer / Reference or order number
x...y °C	Lagern zwischen x und y Grad Celsius / Store between x and y degree Celsius
CE	CE-Markierung bei Erfüllung der IVD Richtlinie 98/79 EG CE-marking according to IVD guideline 98/79 EG
CE 0197	CE-Markierung bei Erfüllung der IVD Richtlinie 98/79 EG gemäß Anhang II, Liste B CE-marking according to IVD guideline 98/79 EC according to annex II, list B
	Verfallsdatum / Expiry date
AG	Antigen
CAG	Kontrollantigen / Control antigen
POS	Positivkontrolle / Positive control
NEG	Negativkontrolle / Negative control
TIT	Titer
WDIL	Arbeitsverdünnung / Working dilution
COMP	Komplement / Complement
CFTB	KBR Puffer / CFT buffer
AMB	Amboceptor / Amboceptor
DIL	Verdünnen oder lösen in / Dilute or disolve in
AQUA	Destilliertes Wasser / Distilled water
IVD	In-vitro Diagnostik Anwendung / In-vitro diagnostic use
1121	Adenovirus
1297	Brucella
1207	Campylobacter fetus ssp.
1206	Campylobacter jejuni
1122*	Chlamydia
1227	Coxiella burnetii (Q-Fieber) Phase I / Coxiella burnetii (Q-fever) Phase I
1123	Coxiella burnetii (Q-Fieber) Phase II / Coxiella burnetii (Q-fever) Phase II
9060	Coxsackievirus A9
1172	Coxsackievirus B1
1173	Coxsackievirus B2
1174	Coxsackievirus B3
1175	Coxsackievirus B4
1176	Coxsackievirus B5
1177	Coxsackievirus B6
1178	Coxsackievirus Pool (A9, B1–B6)
1130*	Cytomegalovirus
1180	Echovirus Pool (4, 6, 9, 14, 24, 30)
1132	Epstein-Barr Virus
1192	FSME Virus / TBE Virus
1154	Herpes Simplex Virus 1/2
1112	Influenza A Virus
1113	Influenza B Virus
1114	Influenza A/B Virus Pool
1224	Legionella pneumophila
9120	Leptospira biflexa
9090	Leptospira canicola
9070	Leptospira grippotyphosa
9080	Leptospira icterohaemorrhagiae
9100	Leptospira pomona
9110	Leptospira sejroe
1234	Listeria monocytogenes
1190	Masernvirus / Measles Virus
1125	Mumpsvirus / Mumps Virus
1111	Mycoplasma pneumoniae
1253	Neisseria gonorrhoeae
1116	Parainfluenza Virus 1
1117	Parainfluenza Virus 2
1118	Parainfluenza Virus 3
1115	Parainfluenza Virus Pool (1, 2, 3)
1126	Picorna Virus
1124	Respiratorisches Synzytial-Virus / Respiratory Syncytial Virus
1193	Rotavirus
1331*	Toxoplasma gondii
1191	Varizella-Zoster-Virus / Varicella Zoster Virus
1203	Yersinia enterocolitica 03
1209	Yersinia enterocolitica 09
1201	Yersinia pseudotuberculosis

* CE 0197