

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 humanem 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 Indikatortest benutzt. Eine spezifische Aktivierung erfolgt nur unter Beteiligung der Immunglobulinklassen IgG-, IgG-, IgG- 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 Patientenserren 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 <span> </span> % Thiomersal; Gebrauchsverdünnung: <b>Verdünnung gemäß der Angabe auf dem Etikett</b> in KBR Puffer herstellen (z.B. 1:4); <b>Es wird empfohlen die Gebrauchsverdünnung immer frisch anzusetzen!</b>
----------------------------------	---
























































































































































































































**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 vereinzeltren 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 <span> </span> % Natriumazid; Gebrauchsverdünnung: <b>1:10 Verdünnung in KBR Puffer herstellen</b> ; 30 Min. bei 56 <span> </span> °C im Wasserbad inaktivieren. <b>Es wird empfohlen die Gebrauchsverdünnung immer frisch anzusetzen!</b>
----------------------------------	---

**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)

Hersteller / Manufacturer


<b>Institut Virion\Serion GmbH</b> Friedrich-Bergius-Ring 19   D-97076 Würzburg, Germany Tel. +49 (0)931 30 45 0   Fax +49 (0)931 30 45 100 E-Mail info@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 <span> </span> % 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	Konservierungsmittel: < 0,1 <span> </span> % Natriumazid; Gebrauchsverdünnung: siehe Angaben auf dem Etikett
--------------------	--

**Lagerung und Haltbarkeit:** bei 2–8 °C unverändert 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

**Hersteller der Erythrozyten ist Institut Viron\Serion GmbH. Bitte beziehen Sie unsere Erythrozyten Suspensionen von der Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH. (Ochsenhausen; www.labormerk.de)**

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

**1 %ige Hammel-Erythrozyten Suspension**

**5.7 Gebrauchsfertiges Hämolytisches System**

**Hersteller des Hämolytischen System ist Institut Virion\Serion GmbH. Bitte beziehen Sie das gebrauchsfertige Hämol. System von der Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH. (Ochsenhausen; www.labormerk.de)**

### 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 Laborausüstung (Pipetten, Labortrimer, 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 (Ø0 x 11/2 mm); Plastikröhrchen für Antigen und Kontrollantigen Verdünnung (Ø0 x 16 mm, Polystyrol); Zentrifugentröhrchen (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

- Patientenserren, 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)

Verdünte 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 unverändertem Komplement können diese Seren in der KBR getestet werden.

Zur Vorbehandlung wird das Serum 1+1 mit Komplement verdünnt, z.B. 100µl Serum (unverändert) + 100µl Komplement (unverändert). Der Ansatz wird für 30 Min. bei 37 °C (Wasserbad) oder 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 800µl 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. Autoimmunerkrank



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

### 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
<b>storage and stability:</b> as powder at 2–8 <span> </span> °C until expiry date (see label); dissolved at 2–8 <span> </span> °C: 12 weeks (to avoid contamination please store in aliquots)		

### 5.6 Erythrocytes

**Manufacturer is Institut Virion\Serion GmbH. Please order our erythrocyte suspensions from Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen, Germany (www.labormerk.de)**

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

### 1% sheep erythrocytes

### 5.7 Ready-to-use Hemolytic System

**Manufacturer is Institut Virion\Serion GmbH. Please order our hemolytic system from Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen, Germany (www.labormerk.de)**

### 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 and 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 aggragation, 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!

	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.	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
pos.-control												
neg.-control												
patient 1												
patient 2												
patient 3												
etc.												
compl. control		<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>			<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>	

**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 1<sup>st</sup> 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 button 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 <span> </span> %	inhibition of hemolysis records a value of	4 = positive
75 <span> </span> %	inhibition of hemolysis records a value of	3 = positive
50 <span> </span> %	inhibition of hemolysis records a value of	2 = negative
25 <span> </span> %	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<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, 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. Gonorrhoea, 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 5<sup>th</sup> Edition*)
**Brucella:** potentially Yersinia enterocolitica 09, Francisella tularensis, Coxiella burnetii, Vibrio cholerae (*Bundle et al., 1984; Araj et al 1988; Corbel et al., 1997*)
**Campylobacter fetus/spp., 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., 1999*)

**Leptospira biflexacanicola/grippotyphosa/icterohaemorrhagiae/pomona/seiroye:** 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 dentrificans (*Freundlich et al., 1982; Ng et al., 2005*)
**Parainfluenza Virus:** potentially mumps virus (*Hendrickson et al., 2003*)
**Picornia Virus:** see Coxsackievirus
**Poliovirus:** see Coxsackievirus
**Respiratory Syncytial Virus:** no cross-reactions known (*Virology, Fields 5<sup>th</sup> Edition; Hendry et al., 1982*)
**Rotavirus:** no cross-reactions known (*Mertens 2004*)

**Sensitivity/Specificity**
**Sensitivity:** potentially 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; APMSIS 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
Bundel et al., Serological Confirmation of Brucella abortus and Yersinia enterocolitica 0:9 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., Faise-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 bovisfelis) 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 5<sup>th</sup> Edition

Sensitivität/Spezifität Sensitivity/Specificity	Leistungsbewertung/ Performance Evaluation	
	Sens. [%]	Spez./Spec. [%]
Adenovirus	90	>99
Brucella	89	99
Campylobacter fetus/spp.	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/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	83	82
Leptospira icterohaemorrhagiae		
Leptospira pomona		
Leptospira seiroye		
Masern/Measles Virus	75,5	>99
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
Picornia Virus	81,3	83,3
Poliovirus	60	50
Respiratorisches Syncytial Virus / Respiratory Syncytial Virus	88	>99
Rotavirus	>99	>99
Toxoplasma gondii	83,2	94,8
Varicella Zoster Virus	62	>99
Yersinia enterocolitica 03 Yersinia enterocolitica 09	35	96
Yersinia pseudotuberculosis		
Sensitivitäten und Spezifitäten wurden gegen Referenztestz (z.B. ELISA) oder klinische Befundungen ermittelt.		
Zur Bestimmung der Präzision wurden vorbereterete 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 vorbereterete Seren mit verschiedenen Anti-körperaktivitäten (Titern) mit SERION KBR Antigenen unterschiedlicher Chrgen analysiert. Dabei wurde stets der Zielwert mit einer Präzision von +/-1 Titerstufe erreicht.		
Nachweisgrenze: Die untere Nachweisgrenze der KBR wird durch eine 75%ige Hämo-lysehemmung charakterisiert.		
Störfaktoren: Lipämische, hämolytische sowie ikterische Proben sollten nur unter Vorbehalt eingeschickt 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 induzieren.		
Sensitivities and specificities were determined in comparison to reference assays (e.g. ELISA) or clinical pre-evaluations.		