

Nachweis und Messung von Diphtherie Antitoxin mit dem Toxin-Neutralisationstest (Vero-Zellkultur)

WOLF D. KUHLMANN

*Radioonkologie, Klinische Kooperationsseinheit Strahlentherapie DKFZ Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg*

Reagenzien, Zellkulturprodukte

1. Diphtherie-Toxoid
Diphtherie-Toxoid (Behringwerke, Marburg) 2.900 Lf/ml
Gebrauchslösung: 0.001 Lf/ml Zellkulturmedium
2. Diphtherie-Antitoxin Standardserum
Diphtherie-Standard-Serum (Behringwerke, Marburg), z.B. Charge DSS2 = 9 IE/ml
Gebrauchslösung: 0.008 IE/ml Zellkulturmedium
3. *VERO*-Zellen
4. Zellkulturprodukte
Lösungen:
 - Medium 199 mit Earle's Salzen (plus Indikator) und 20 mM HEPES
 - 200 mM L-Glutamin
 - Foetales Rinderserum (FCS)
 - Earle's Salzlösung ohne Calcium/Magnesium
 - 0.05% Trypsin (1:250) – 0.02% EDTA Gemisch (= 1x Trypsin – EDTA Lösung)
 - Penicillin (10.000 IE/ml) und Streptomycin (10.000 µg/ml) in 0.15 M NaCl
5. Komplettes Zellkulturmedium für Vero-Zellen:
Medium 199 mit Earle's Salzen (Indikator) und 20 mM HEPES plus 2 mM L-Glutamin plus 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin plus 5% FCS
6. Patientenproben:
Sera von Patienten mit unbekanntem Diphtherie Antitoxintiter

Durchführung des Toxin-Neutralisationstests in der Vero-Zellkultur

1. Zellkultur in der Mikrotiterplatte:
 - in alle Vertiefungen außer A(1) bis F(1) und Reihe H(1 bis 12):
50 µl komplettes Zellkulturmedium
 - Reihe H(1 bis 12):
100 µl komplettes Zellkulturmedium (für die Zellkontrolle)

- Vertiefungen A(1) bis E(1) jeweils 100 µl der zu prüfenden Patientenproben
- Vertiefung F(1) 100 µl Diphtherie Antitoxin 0.008 IE/ml
- Reihe A bis Reihe F: Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe (Faktor 2) mit einer Multikanalpipette (jeweils 50 µl)
- Zugabe von jeweils 50 µl Diphtherie-Toxoid (0.001 Lf/ml) in alle Vertiefungen der Reihen A bis G
- Mikrotiterplatte leicht schwenken, mit Deckel abdecken und 1 Stunde bei RT (Raumtemperatur) inkubieren
- Zugabe von 50 µl *VERO*-Zellen in Suspension (2.5×10^5 Zellen/ml) in alle Vertiefungen, Platte leicht schwenken, mit Folie luftdicht abkleben und 6 Tage bei 37°C inkubieren.

2. Auswertung:

- makroskopisch **gelb** = intakter Zellrasen
makroskopisch **rot** = CPE (cytopathischer Effekt)
- letzte Vertiefung in jeder Reihe zeigt einen Farbumschlag von rot nach gelb, d.h. kein CPE nachweisbar (auch mikroskopisch *kein CPE* nachweisbar)
- in der Standardreihe F sollte **F 3 gelb** gefärbt und **F 4 rot** (= 1. CPE) gefärbt sein, i.e. in der Serumverdünnung, die 0.001 IE/ml entspricht

3. Berechnung des Diphtherie Antitoxintiters in unbekannter Patientenprobe:

$$- \frac{\text{Verdünnung des Patientenserums}}{\text{Verdünnung des Bezugserums}} \times 0.008 \text{ IE/ml}$$