

**VIROTECH Tetanus IgG ELISA
(Tetanus IgG ELISA)**

Bestell-Nr.: EC124.00

Farbcodierung: weiß/transparent

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt (IgG Testkit)	3
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	3
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	4
8. Testdurchführung	4
8.1 Untersuchungsmaterial	4
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	5
9. Testauswertung	6
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Auswertung	6
9.3 Interpretation	7
9.4 Grenzen des Tests	7
10. IgG Testauswertung mit der 4-Parameter Methode	8
10.1 Testfunktionskontrolle	8
10.2 Umrechnung der quantitativen Ergebnisse in internationale Units pro Milliliter (IU/ml)	8
11. Leistungsdaten	9
11.1 Sensitivität und Spezifität	9
11.2 Nachweisgrenze	9
11.3 Richtigkeit	9
11.4 Wiederfindungsrate	9
11.5 Durchseuchung (erwartete Werte)	9
11.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	9
11.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	9
12. Literatur	9
13. Testablaufschemata	11

1. Verwendungszweck

Der Tetanus ELISA dient dem quantitativen Nachweis von IgG Antikörpern gegen das Tetanus-Toxoid zur Überwachung des Impf Erfolges und der Ermittlung des Impfstatus.

2. Diagnostische Bedeutung

Tetanus wird durch *Clostridium (C.) tetani* verursacht, ein obligat anaerobes, sporenbildendes Bakterium. Seine Sporen kommen ubiquitär im Erdboden vor und sind extrem widerstandsfähig gegenüber Hitze und Desinfektionsmittel. Die vegetative Form von *C. tetani* bildet das Tetanolysin und Tetanospasmin, zwei Exotoxine, von denen das Tetanospasmin die typischen klinischen Symptome, wie erhöhter Muskeltonus und Spasmen, verursacht. Zu unterscheidende klinische Formen des Tetanus sind die generalisierte, die lokale und die neonatale Erkrankung (1).

Der Erreger kann über verschmutzte Wunden in den menschlichen Organismus eindringen und stellt somit ein Infektionsrisiko dar. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern ist für die Diagnose der Infektion ohne Bedeutung. Wichtiger und dafür geeignet ist die serologische Bestimmung der IgG Antikörper um Hinweise zur Tetanusimmunität zu erhalten (1). Ein aktueller Impfschutz ist für jeden, insbesondere auch für ältere Menschen (da diese oftmals nicht ausreichend immunisiert sind) eine dringende Notwendigkeit (4,5). Insgesamt liegen die Tetanus-Impfraten über denen anderer Impfungen, wie z.B. Diphtherie (5,8). Die periodische Auffrischung der erfolgten Grundimmunisierung sollte jeweils im Abstand von 10 Jahren erfolgen. Sehr häufig unterbleibt jedoch die Auffrischung, so dass der Impfschutz oftmals nicht ausreichend ist (1).

Mittels des vorliegenden Elisas lässt sich die IgG-Antikörperkonzentration bestimmen und somit Rückschlüsse auf den Impfstatus ziehen. Desweiteren kann er zur Prüfung der Impfnotwendigkeit sowie zur Impfkontrolle nach einer erfolgten Impfung herangezogen werden.

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

4. Packungsinhalt (IgG Testkit)

1. **1 Mikrotiterplatte** bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig) 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert) 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG-Ak-Standardseren** für die Standardkurve, 6 Fläschchen à 2ml, gebrauchsfertig, Humanserum mit Konservierungsmittel; 0,001IU/ml, 0,002IU/ml, 0,005IU/ml, 0,01IU/ml, 0,02IU/ml, 0,05IU/ml (IU = international units, internationale Einheiten).
5. **IgG hoch positive Kontrolle, 2ml**, Humanserum mit Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG schwach positive Kontrolle, 2ml**, Humanserum mit Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
8. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
9. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.

- Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden sondern ist zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	Verdünnt	+2 bis +8°C	max. 6h
	Unverdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Kontrollen	nach öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
RF Sorbo Tech	nach öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	Verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Konjugat	nach öffnen	+2 bis +8°C (Lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach öffnen	+2 bis +8°C (Lichtgeschützt)	3Monate
Stopplösung	nach öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	Endverdünnt (Gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Als Standard- und Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Standardseren, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
- Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopp-Lösung und TMB wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
- Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

- Aqua dest./demin.
- Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
- Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
- Reagenzgläser
- Zellstofftücher
- Abdeckung für ELISA-Platten
- Abfallbehälter für infektiöses Material
- ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
- Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist die Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Die Patientenproben können 1 Woche bei 2-8°C aufbewahrt werden.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen. Haltbarkeit maximal 6h bei 2-8°C.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

- Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.

2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. **Die Standardseren sowie hoch und schwach positive Kontrolle sind ausschließlich für den verwendeten Testkit bestimmt.** Daher nicht in anderen Chargen einsetzen.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der gebrauchsfertigen Standard- und Kontrollseren sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Standardseren, Kontrollen und Patientenseren). Wird, für die Auswertung des Tests mittels der 4-Parameter Methode, als Kalibrierungskontrolle der Standard 0,01 IU/ml verwendet, ist hiervon ein Doppelansatz zwingend erforderlich. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation des Konjugats: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschemata siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden.

Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

9.1 Testfunktionskontrolle

- a) OD-Werte
Der OD-Wert des Leerwertes sollte $<0,15$ sein
Die OD Werte des niedrigsten Standards (0,001 IU/ml) sollten oberhalb des im Qualitätskontroll-Zertifikat angegebenen OD-Wertes liegen und die OD Werte des höchsten Standards (0,050 IU/ml) sollten unterhalb des im Qualitätskontroll-Zertifikat angegebenen OD-Wertes liegen.
- b) Die ermittelte Konzentration der schwach- und hoch positiven Kontrolle sollte innerhalb des im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Referenzbereiches (IU/ml) liegen.
- c) Werden die Anforderungen (OD / IU/ml) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

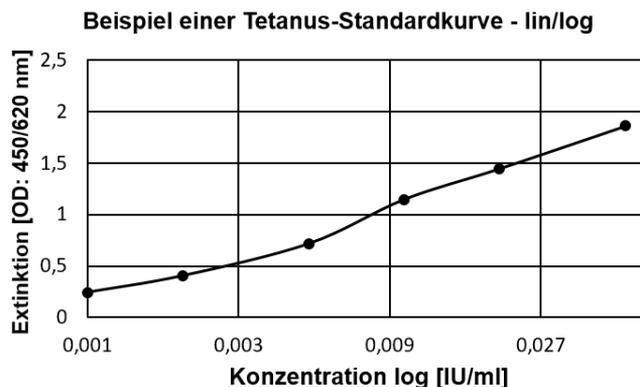
9.2 Auswertung

Mit Hilfe der mitgeführten Standards wird eine Standardkurve zur Berechnung des Tetanus-Antitoxoid-IgG-Antikörpergehaltes im Serum erstellt. Hierzu trägt man die Mittelwerte der Extinktionen der doppelt mitgeführten Standardseren auf die Ordinate (y-Achse) und die Konzentrationen (IU/ml der gebrauchsfertigen Standards) auf die Abszisse (x-Achse) ein. Es ist zu beachten, dass die Patientenseren für die Testdurchführung 1:100 verdünnt wurden. Daher muss das abgelesene Ergebnis aus dem Diagramm mit 100 multipliziert werden. Bei der Erstellung der Standardkurve kann sowohl eine Punkt-zu-Punkt-Kurvenberechnung, als auch eine 4-Parameterkurvenberechnung gewählt werden.

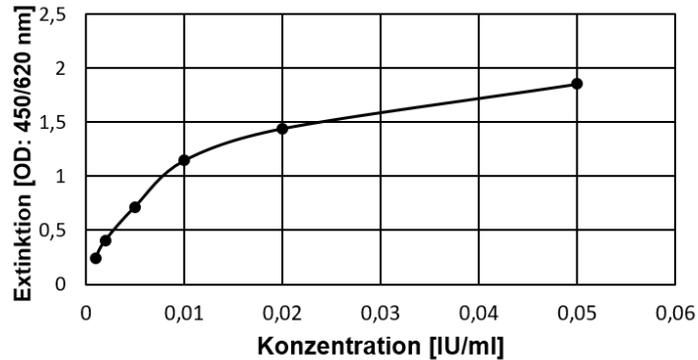
Bitte beachten:

Proben, deren ermittelte IU/ml-Konzentrationen unter 0,1IU/ml liegen, können in einem erneuten Testansatz mit einer 1:10 Verdünnung eingesetzt werden. Die abweichende Verdünnung muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Proben, deren Extinktionswerte größer sind als der des 0,05IU/ml-Standards, müssen in einer höheren Verdünnung im Test eingesetzt werden, z.B. 1:200, 1:400 usw. Bei OD-Werten über 2,00 nimmt die Messgenauigkeit mit steigender optischer Dichte ab. Es wird daher empfohlen, die Seren, welche mit einer 1:100 Verdünnung OD-Werte über 2,00 erzielen, in einer höheren Verdünnung im Test, z.B. 1:200, 1:400 usw. einzusetzen. Die abweichenden Verdünnungen müssen bei der Auswertung berücksichtigt werden.



Beispiel einer Tetanus-Standardkurve - lin/lin



9.3 Interpretation

Die Tetanus Antitoxid-Konzentrationen werden in Anlehnung an die WHO Standards in Internationalen Einheiten (IU/ml) ausgedrückt. Ein Tetanus-Antitoxid-IgG-Antikörpergehalt >0,1IU/ml wird als Immunschutz (2,11) bzw. sicherer Immunschutz (9,10) angegeben. Auffrischimpfungen sind bei Antikörperkonzentrationen über 0,5 IU/ml nicht angezeigt (10).
Nachfolgend möchten wir auf folgende Impfpfehlungen hinweisen. Diese sind in Anlehnung an die Empfehlungen des Arbeitskreises Immunprophylaxe (13) erstellt:

IU/ml	Interpretation und weiteres Vorgehen
< 0,01	- kein Impfschutz - je nach Anamnese Grundimmunisierung oder Auffrischimpfung erforderlich - serologische Kontrolle nach 4 bis 8 Wochen
0,01 – 0,1	- Impfschutz unsicher - Auffrischimpfung erforderlich - serologische Kontrolle nach 4 bis 8 Wochen
0,11 – 0,5	- Impfschutz noch kurzfristig vorhanden - Auffrischimpfung empfohlen - Auffrischimpfung führt zu langfristigem Impfschutz
0,51 – 1,0	- Impfschutz vorhanden - Auffrischimpfung oder serologische Kontrolle nach 3 Jahren empfohlen - Hinweis: Impfungen bei Antikörperkonzentrationen > 0,5 IU/ml können zu unerwünschten Impfreaktionen führen
> 1,0 – 5,0	- langfristiger Impfschutz vorhanden - Auffrischimpfung oder serologische Kontrolle nach frühestens 5 Jahren empfohlen
> 5,0 – 10,0	- langfristiger Impfschutz vorhanden - Auffrischimpfung oder serologische Kontrolle nach frühestens 8 Jahren empfohlen
> 10	- langfristiger Impfschutz vorhanden - Auffrischimpfung oder serologische Kontrolle nach frühestens 10 Jahren empfohlen

9.4 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. Der VIROTECH Tetanus ELISA ist nicht für die Labordiagnose einer Infektion geeignet.

3. Zur Interpretation des Antitoxiditers sollte auch der Impfausweis bzw. Hinweis zur letzten Tetanus-Schutzimpfung herangezogen werden (7).
4. Eine Interpretation von Antitoxiditern unter 0,1 IU/ml ist nicht zu empfehlen, da sie unterhalb der technisch reproduzierbaren Sensitivitätsgrenze bei Verwendung eines ELISA Testsystems liegt. Die Impfanamnese sollte im individuellen Fall herangezogen werden, um zu entscheiden, ob eine Grundimmunisierung oder eine Auffrischimpfung durchgeführt werden soll (⇒ 10.2).

10. IgG Testauswertung mit der 4-Parameter Methode

Es besteht die Möglichkeit, mit dem VIROTECH Tetanus IgG ELISA eine quantitative Bestimmung mit der 4-Parameter-Methode durchzuführen. Als Kalibrierungskontrolle dient hier der Standard 0,01 IU/ml. Die Kalibrierungskontrolle gleicht die durch die Testdurchführung bedingten Schwankungen aus. Für die Berechnung werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

10.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Der OD-Wert der Kalibrierungskontrolle muss innerhalb des im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereichs liegen.

b) IU/ml

Die anti-Tetanus IgG-Konzentrationen (IU/ml) der schwach positiven Kontrolle und der stark positiven Kontrolle müssen innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, IU/ml) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

10.2 Umrechnung der quantitativen Ergebnisse in internationale Units pro Milliliter (IU/ml)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muss von allen Extinktionen abgezogen werden.

Die Quantifizierung der Patientenserum erfolgt durch Angleichung an die internationalen Units. Durch umfassende Testungen wird die Standardkurve über nicht-lineare Regression bestimmt und mathematisch durch folgende Formel beschrieben (12):

$$\text{IU/ml} = \exp(-(\ln((D-A)/((\text{OD korr})-A)-1)-B)/C)$$

Hierbei ist

- A: erwartete OD bei einer anti-Tetanus IgG Konzentration von 0
- B: Steigungsfaktor
- C: Wendepunkt
- D: erwartete OD bei einer unendlich hohen anti-Tetanus IgG Konzentration
- OD korr: korrigierte OD des Patientenserums

Zur Berücksichtigung von Schwankungen innerhalb der Testabarbeitung wird die gemessene OD des Patientenserums anhand einer Kalibrierungskontrolle korrigiert:

$$\text{OD korr} = \text{OD Patientenserum} * \frac{\text{OD Kalibrierungskontrolle Vorgabe}}{\text{OD Kalibrierungskontrolle gemessen}}$$

Die Werte der Parameter A, B, C und D, sowie die Vorgabe für die OD der Kalibrierungskontrolle sind dem Zertifikat zu entnehmen.

Für eine mit dieser Berechnungsmethode nicht kompatible Auswertesoftware sind in dem Zertifikat zusätzlich 6 Standard-Wertepaare definiert, welche ebenfalls die Standardkurve beschreiben.

Der quantifizierbare Bereich liegt zwischen 0,01 IU/ml und 15 IU/ml.

Bestimmung der IU/ml

Die Bestimmung der IU/ml kann durch eine Software erfolgen, die von VIROTECH bezogen werden kann. Alternativ kann eine Auswertevorlage für gängige Tabellenkalkulationen zur Verfügung gestellt werden. Die berechneten Konzentrationen geben immer die tatsächlichen Konzentrationen des unverdünnten Serums an, wenn dieses im Test 1:100 verdünnt wurde. Wurde ein Serum in einer anderen Verdünnung getestet, müssen die Konzentrationen entsprechend umgerechnet werden.

11. Leistungsdaten

11.1 Sensitivität und Spezifität

Da es sich um einen quantitativen Test handelt, der nicht zur Differenzierung von positiven und negativen Ergebnissen dient, kann keine diagnostische Sensitivität und Spezifität berechnet werden.

11.2 Nachweisgrenze

In hausinternen Testungen konnte eine untere reproduzierbare Nachweisgrenze von 0,06 IU/ml bei einem Variationskoeffizienten von 3,9 % ermittelt werden.

11.3 Richtigkeit

Es wurden in dem Zeitraum März 2002 bis November 2009 32 Ringversuchseren mit bekannten Konzentrationen im VIROTECH ELISA gemessen. 30 deklarierte Seren wurden richtig erkannt. Zwei Seren trafen die Vorgaben nicht.

11.4 Wiederfindungsrate

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate des Tetanus ELISA's wurde der internationale Standard der WHO für Tetanus Immunglobulin (human) TE-3 im VIROTECH ELISA eingesetzt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung wurde die Konzentration in IU/ml mit Hilfe der Standardkurve berechnet und mit dem zu erwartendem Ausgangswert verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß in dem diagnostisch relevanten unteren Bereich der Standardkurve (0,1 bis 0,5IU/ml) die Ausgangskonzentration von 120 IU/ml exakt wiedergefunden werden konnte.

11.5 Durchseuchung (erwartete Werte)

Es wurden 117 Blutbankseren getestet und die Konzentration in IU/ml bestimmt.

Konzentration	Zahl der gefundenen Seren
< 0,01 IU/ml	0 %
0,01 – 0,1 IU/ml	7 %
0,11 – 0,5 IU/ml	15 %
0,51 – 1,0 IU/ml	26 %
> 1,0 – 5,0 IU/ml	51 %
> 5,0 – 10,0 IU/ml	1 %
> 10,0 IU/ml	0 %

Die ermittelte Verteilung entspricht etwa den Durchseuchungszahlen, wie sie in verschiedenen Literaturstellen angeführt werden (3,6). Da keine Angaben über das Alter der Blutspender vorliegt, lassen sich die Daten nur bedingt vergleichen.

11.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit einem Serum getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient liegt unter 9%.

11.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 3 Seren getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten liegen unter 15%.

12. Literatur

1. Epidemiologisches Bulletin, 27/2002
2. Stark K, Schonfeld C, Barg J, Molz B, Vornwald A, Bienzle U, Seroprevalence and determinants of diphtheria, tetanus and poliomyelitis antibodies among adults in Berlin, Germany, Vaccine 17(7-8): 844-50 (1999)

3. Pietsch M et.al. , Influence of information campaigns on the vaccination immunity among the population of a small town area – seroepidemiological results of the „Wittlich Vaccination Study“; Gesundheitswesen 64 (1): 60-4 (2002)
4. Epidemiologisches Bulletin, 7/2002
5. Epidemiologisches Bulletin, 19/1999
6. Epidemiologisches Bulletin, 40/1998
7. Epidemiologisches Bulletin, 28/2001
8. Epidemiologisches Bulletin, 23/1999
9. Werner, G. T., et. al., Tetanusimmunität im Alter, Zeitschrift für Gerontologie, 16, 130-133 (1983)
10. Müller, H. E. et al., Tetanus-Schutzimpfung-Indikation und Kontraindikation, Dtsch. med. Wsch. 113 (1988), 1326-1328
11. Schröder, J. P. et al., Vermeidung hyperergischer Reaktionen bei Tetanus-Impfungen durch Einsatz eines wissenschaftlichen Systems bei Fragen der Impfnotwendigkeit, Klin. Lab. 1992, 38:229-233
12. Plikaytis et al., Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate Neisseria meningitidis Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 1991, J Clin Microbiol, 29, p1439-1446
13. Arbeitskreis Immunprophylaxe, Koordinator M. Pietsch: Infektionsschutz durch Impfprophylaxe, Storck Medien & Verlag KG, Bruchsal 1999

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

▼ **IgG-Proben – Verdünnung**
1:101

z.B.:

10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

Testdurchführung

Probeninkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Patientenproben Leerwert (Verdünnungspuffer), Standards und Kontrollen
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Konjugatinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Konjugat IgG
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Substratinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Substrat
↓		
Abstoppen		50 µl Stopplösung vorsichtig schütteln
↓		
Extinktion messen		Photometer bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm)