

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

objednací číslo: EC124.00

barevné kódování: bílá / průhledná

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

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

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



Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy IgG/IgM.....	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití	3
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)	4
7. Testování	4
7.1 Testovaný materiál.....	4
7.2 Příprava reagensů.....	4
7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH.....	4
7.4 Použití analyzátorů ELISA.....	5
8. Vyhodnocení testu	5
8.1 Kontrola funkčnosti testu	5
8.2 Vyhodnocení	5
8.3 Interpretace.....	6
8.4 Limity testu.....	7
9. Vyhodnocení testu (zkoušky) IgG metodou 4 parametrů	7
9.1 Funkční kontrola testu.....	7
9.2 Přepočet kvantitativních výsledků na mezinárodní jednotky na mililitr (IU/ml)	7
10. Literatura.....	8
11. Schéma provedení testu (Testablaufschemata)	9

1. Účel použití

Přípravek Tetanus ELISA slouží ke kvantitativnímu prokázání protilátek IgG proti tetanovému toxidu ke sledování úspěchu očkování a ke zjištění stavu očkování.

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změni na žluté.

3. Obsah soupravy IgG/IgM

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **Ředící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **Standardní séra IgG-Ak** pro standardní křivku, 6 lahviček à 2 ml, připravených k použití, lidské sérum s konzervačním prostředkem; 0,001 IU / ml, 0,002 IU / ml, 0,005 IU / ml, 0,01 IU / ml, 0,02 IU / ml, 0,05 IU / ml (IU = international units, mezinárodní jednotky).
5. **Vysoce pozitivní kontrola IgG, 2 ml**, lidské sérum s konzervačním prostředkem, připravené k použití.
6. **Slabě pozitivní kontrola IgG, 2 ml**, lidské sérum s konzervačním prostředkem, připravené k použití.
7. **IgG konjugát (anti-human), 11ml**, (ovčí nebo ostrucha křivočará)-křen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
8. **Substrátový roztok tetrametylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
9. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensů je vyznačena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Činidla ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě, že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetrametylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po zředění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a shledána negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová pipeta 50µl, 100µl
3. Mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buničiny
6. Víčka na destičky ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destiček
9. Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor

7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního předpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagancií), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Vzorky pacientů lze skladovat 1 týden při teplotě 2-8°C.

Zředění pacientů používejte vždy čerstvá. Stabilita při teplotě 2 - 8°C je maximálně 6 hodin.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení .

1. Používejte pouze čerstvá, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagensí

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysoký stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k ředění a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny šarže a parametry. **Standardní séra, jakož i vysoce a slabě pozitivní kontrola jsou určeny výhradně pro konkrétní použitý testovací kit.** Proto je nepoužívejte v jiných šaržích.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započítím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna činidla temperována na pokojovou teplotu .
3. Všechny tekuté reagensie před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentrátu tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepejte).

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Pro jednu testovací várku odpipetujte 100 µl zředovacího pufru připraveného k použití (prázdná hodnoty), standardních a kontrolních sér připravených k použití, jakož i zředěných sér pacientů. Doporučujeme vždy dvojitou várku (prázdná hodnota, standardní séra, kontroly a séra pacientů). V případě, že pro hodnocení testu prostřednictvím 4parametřové metody, se jako kontrola kalibrace použije standard 0,01 IU/ml, je použití duplikátů nutné. Pracovní zředění sér pacienta : 1+100; např. 10µl sérum + 1ml zředovacího pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destička se zakryje víčkem).

3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí čtyřikrát promývacím roztokem 350 - 400µl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100µl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po Inkubaci konjugátu následuje čtyřnásobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destičku opatrně a pečlivě protřepete poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně žlutě zbarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl o odečteno od absorbancí kontrol a vzorků.. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

7.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA překontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Překontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

8. Vyhodnocení testu

8.1 Kontrola funkčnosti testu

- a) Hodnoty optické density
OD-hodnota slepého vzorku musí být $<0,15$.
Hodnoty OD nejnižšího standardu (0,001 IU/ml) musí být vyšší než hodnoty OD zadané v certifikátu kontroly kvality a hodnoty nejvyššího standardu (0,050 IU/ml) musí být nižší než hodnoty OD zadané v certifikátu kontroly kvality.
- b) Zjištěná koncentrace slabě a vysoce pozitivní kontroly by měla být uvnitř referenční oblasti, uvedené v certifikátu o kontrole kvality (IU / ml).
- c) Pokud požadavky (OD / IU/ml) nebudou splněny, test se musí opakovat.

8.2 Vyhodnocení

Za pomoci standardů, které máte u sebe, se na přiloženém semilogaritmickém millimetrovém papíře zkonstruuje standardní křivka k vypočtení obsahu protilátek IgG proti toxoidu tetanu v séru. K tomu je třeba zanést střední hodnoty extinkce dvakrát u sebe držených standardních sér na ordinátu (osu y) a koncentrace (v IU / ml standardů připravených k použití) na vodorovnou osu (osu x). Je třeba dbát na to, aby séra pacientů byla před provedením testu zředěna v poměru 1 : 100. Proto se musí výsledek odečtený z grafu vynásobit 100. Při vytváření standardní křivky lze zvolit jak dvoubodový výpočet křivky tak i 4parametrový výpočet křivky.

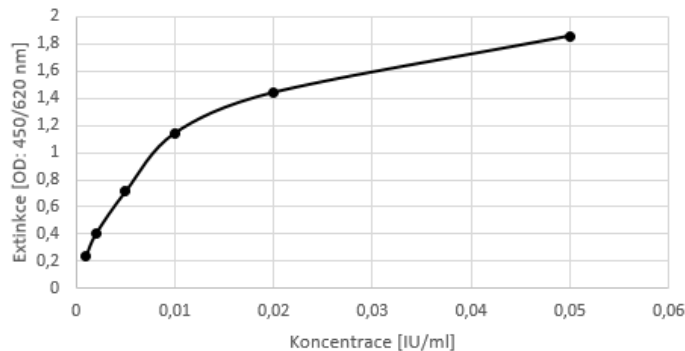
Prosíme dbejte na toto :

Sondy, jejichž zjištěné koncentrace IU/ml leží pod hodnotou 0,1 IU/ml, mohou při novém nasazení testu být naředěny v poměru 1:10. Odlišné ředění se musí brát do úvahy při vyhodnocování.

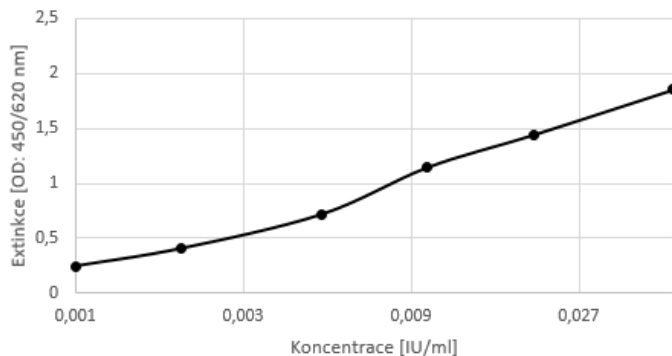
Vzorky, jejichž extinkční hodnoty jsou vyšší než hodnota standardu 0,05 IU / ml, musí být v testu nasazeny s vyšším zředěním, například 1 : 200, 1 : 400 apod. Při hodnotách optické hustoty nad 2,00 klesá přesnost měření se stoupající optickou hustotou.

Proto se pro séra, která při ředění 1:100 dosahují hodnot optické hustoty přes 2,0, doporučuje provádět testy s vyšším ředěním, např. 1:200, 1:400 atd. Tato odlišná zředění musí být zohledněna při vyhodnocení.

Příklad standardní křivky tetanu - lin/lin



Příklad standardní křivky tetanu - lin/log



8.3 Interpretace

Koncentrace tetanového antitoxid jsou v souladu se standardy Světové zdravotnické organizace WHO vyjadřovány v mezinárodních jednotkách (IU / ml). Obsah protilátek IgG proti tetanovému toxid > 0,1 IU / ml je uváděn jako imunitní ochrana (2,11), popřípadě bezpečná imunitní ochrana (9,10). Posilující očkování není vhodné při koncentraci protilátek nad 0,5 IU/ml (10). V následujícím textu chceme upozornit na některá doporučení týkající se očkování. Tato doporučení byla vyhotovena dle údajů pracovní skupiny pro imunitní profylaxi (13):

IU/ml	Interpretace a další postup
< 0,01	- žádná očkovací ochrana - dle anamnézy je nutná základní imunizace nebo posilující očkování - sérologická kontrola po 4 až 8 týdnech
0,01 – 0,1	- očkovací ochrana nejistá - nutné posilující očkování - sérologická kontrola po 4 až 8 týdnech
0,11 – 0,5	- očkovací ochrana bude ještě po krátkou dobu zajištěna - doporučuje se posilující očkování - posilující očkování zaručuje dlouhodobou očkovací ochranu
0,51 – 1,0	- očkovací ochrana je zajištěna

	- doporučuje se posilující očkování nebo sérologická kontrola po 3 letech - Poznámka: Očkování při koncentraci protilátek > 0,5 IU/ml může vést k nežádoucím reakcím na očkování.
> 1,0 – 5,0	- očkovací ochrana je dlouhodobě zajištěna - posilující očkování nebo sérologická kontrola se doporučují nejdříve za 5 let
> 5,0 – 10,0	- očkovací ochrana je dlouhodobě zajištěna - posilující očkování nebo sérologická kontrola se doporučují nejdříve za 8 let
> 10	- očkovací ochrana je dlouhodobě zajištěna - posilující očkování nebo sérologická kontrola se doporučují nejdříve za 10 let

8.4 Limity testu

1. Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
2. Přípravek VIROTECH Tetanus ELISA není vhodný k laboratorní diagnóze infekce.
3. K interpretaci antitoxinového titru by měl být přibrán také očkovací průkaz, popřípadě upozornění na poslední ochranné očkování proti tetanu (7).
4. Nelze doporučit interpretaci antitoxinových titrů pod 0,1 IU / ml, protože při použití testovacího systému ELISA leží pod hranicí technicky reprodukovatelné senzitivity. V tomto individuálním případě by měla být přibrána očkovací amamnéza, aby mohlo být rozhodnuto, zda má být provedena základní imunizace nebo obnovovací očkování.

9. Vyhodnocení testu (zkoušky) IgG metodou 4 parametrů

Pomocí VIROTECH Tetanus IgG ELISA je možné provést kvantitativní stanovení pomocí metody 4 parametrů. Jako kalibrační kontrola zde slouží standard 0,01 IU/ml. Kalibrační kontrola vyrovnává kolísání podmíněné provedením testu. Pro výpočet se použijí (dosadí) průměrné hodnoty OD hodnot (absorpce).

9.1 Funkční kontrola testu

a) OD hodnoty

OD hodnota prázdné hodnoty by měla být <0,15.

OD hodnota kalibrační kontroly musí ležet uvnitř rozsahu uvedeného v certifikátu kontroly kvality.

b) IU/ml

Koncentrace IgG protilátek proti tetanus (IU/ml) slabě pozitivní kontroly a silně pozitivní kontroly musí ležet uvnitř referenčních rozsahů uvedených v certifikátu kontroly kvality.

Pokud nejsou splněny požadavky (OD hodnoty, IU/ml), je třeba test zopakovat.

9.2 Přepočet kvantitativních výsledků na mezinárodní jednotky na mililitr (IU/ml)

Extinkce prázdné hodnoty (450/620 nm) musí být odečtena od všech extinkcí.

Kvantifikace sér pacientů se provádí aproximací na mezinárodní jednotky. Na základě testování se standardní křivka stanoví pomocí nelineární regrese a je matematicky popsána následujícím vzorcem (12):

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

Kde jsou

- A: očekávaná OD při nulové koncentraci IgG protilátek proti tetanus
B: směrnice (křivky)
C: inflexní bod
D: očekávaná OD při nekonečně vysoké koncentraci IgG protilátek proti tetanus
OD korr: korigovaná OD séra pacienta

K zohlednění kolísání během provedení testu se naměřená OD séra pacienta koriguje pomocí kalibrační kontroly:

$$OD_{\text{korr}} = OD_{\text{sera pacienta}} * \frac{OD_{\text{kalibracni kontroly zadana hodnota}}}{OD_{\text{kalibracni kontroly namerena}}}$$

Hodnoty parametrů A, B, C a D, a také zadané hodnoty pro OD kalibrační kontroly jsou uvedeny v certifikátu.

Pro každé programové vybavení pro vyhodnocení, které není kompatibilní s touto metodou výpočtu, je v certifikátu navíc definováno 6 standardních párů (dvojic), které rovněž popisují standardní křivku.

Kvantifikovatelná oblast leží mezi 0,01 IU/ml a 15 IU/ml.

Stanovení IU/ml

Stanovení IU/ml je možno provést pomocí programového vybavení, které je možno objednat u VIROTECH. Jinou možností z naší strany je také poskytnout předlohu pro vyhodnocení pro běžné tabulkové výpočty. Vypočtené koncentrace vždy znamenají faktickou koncentraci nefeděného séra, pokud toto v rámci zkoušky bylo ředěno na 1:100. Pokud bylo testováno sérum jiného stupně ředění, je nutno odpovídajícím způsobem přepočítat koncentrace.

10. Literatura

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, Storch Medien & Verlag KG, Bruchsal 1999

Příprava vzorků a promývacího roztoku

▼ **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./ demin. vodou na 1 l

▼ **zředění vzorky IgG**
1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

Schéma testu

inkubace vzorků



po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

100 µl zředěného vzorku
100 µl kontrol

blank (ředící roztok na vzorek) standardy a kontroly

4 x promýt



400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

inkubace
s konjugátem

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

100 µl konjugátu
IgG

4 x promýt



400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

inkubace
se substrátem

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C ve tmě

100 µl substrátu

Zastavení reakce
stop roztokem

50 µl stop roztoku
opatrně poklepat

změřit absorbanci

mikrofotometr při
450/620nm
(Délka referenční vlny 620-690nm)