

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

Rendelési szám: EC124.00

Színkód: fehér/átlátszó

CSAK *IN VITRO* DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

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

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



Tartalom

1. Alkalmazás célja.....	3
2. A teszt működési elve	3
3. A készlet tartalma IgG	3
4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések és biztonsági előírások	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)	4
7. A vizsgálat elvégzése	4
7.1 Vizsgálati anyag.....	4
7.2 A reagensek előkészítése	4
7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése.....	4
7.4 ELISA-processzor alkalmazása.....	5
8. A vizsgálati eredmények kiértékelése.....	5
8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése.....	5
8.2 Kiértékelési szempontok	5
8.3 Interpretáció.....	6
8.4 A teszt határai	7
9. IgG tesztkiértékelés négyparaméteres módszerrel	7
9.1 Tesztfunkciókontroll	7
9.2 A kvantitatív eredmények átszámítása milliliterenkénti nemzetközi egységbe (IU/ml).....	7
10. Irodalom	8
11. A vizsgálat folyamatábrája vázlata.....	9

1. Alkalmazás célja

A Tetanusz ELISA a tetanusz toxoid ellen képzett IgG antitestek kvantitatív kimutatásával lehetővé teszi az védőoltás eredményességének ellenőrzését és a vakcinációs státusz felmérését.

2. A teszt működési elve

A humán szérumból kimutatandó antitest immunkomplexet alkot a mikrotiter lemezre rögzített antigénnel. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás eltávolítja. Az említett immunkomplexhez kötődik az enzimkonjugátum. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás ismét eltávolítja. A szubsztrátoldat (TMB) hozzáadása után az enzim (peroxidáz) aktivitása egy kék színyanyagot képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színűre változik.

3. A készlet tartalma IgG

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető lyukból (reakcióedényből) áll (lyofilizált).
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgG-antitest standardszérumok** a standardgörbe felvételéhez; 6 üveg, egyenként 2 ml tartalommal, felhasználásra kész, humán szérum tartósítószerrel; 0,001IU/ml, 0,002IU/ml, 0,005IU/ml, 0,01IU/ml, 0,02IU/ml, 0,05IU/ml (IU = international units, nemzetközi egység).
5. **IgG erős pozitív kontroll, 2 ml**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgG gyenge pozitív kontroll, 2 ml**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgG-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
8. **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'TMB), 11ml**, felhasználásra kész
9. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeveréket tartalmaz

4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága

A teszt készletet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzés tanúsítványt.

1. A szükséges lyukak felhasználása után a fennmaradó lyukakat / csíkokat zárt tasakban, 2-8°C-on, nedvszívó anyaggal együtt kell tárolni. A reagenseket használat után további tárolásra azonnal 2-8°C-ra kell tenni.
2. A felhasználásra kész konjugátum és a TMB oldat fényérzékeny és így ezeket sötétben kell tárolni. Ha a szubsztrátoldatot fény éri és ennek következtében elszíneződik, a továbbiakban nem használható fel. ki kell dobni.
3. Csak az elvégzendő teszthez szükséges mennyiségű felhasználásra kész konjugátumot illetve TMB-t vegye ki az üvegekből. A feleslegben kivett konjugátumot illetve TMB-t ki kell önteni, az üvegekbe azokat visszatölteni nem szabad.

Anyag	Állapot	Tárolás	Tartósság
Vizsgálati minták	Hígított	+2 és +8°C között	max. 6 óra
	Hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mikrotiterlemez	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban szárítószertasakkal)	3 hónap
Reumafaktor – abszorbens	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Hígított	+2 és +8°C között	1 hét
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Tetrametil-benzidin (TMB)	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Leállítóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Végghígított (Használatra kész)	+2 és +25°C között	4 hét

5. Óvintézkedések és biztonsági előírások

1. Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és mikrotiter csík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
2. A tartósítószeret tartalmazó komponensek, a citrát fixáló (stop) oldat és a TMB irritálják a bőrt, a szemet és a nyálkahártyát. Az érintett testrészt folyó vízzel azonnal le kell mosni, és szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
3. A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

1. Desztillált / ioncserélt víz
2. Nyolccsatornás pipetta, 50 µl és 100 µl
3. Mikropipetták: 10 µl, 100 µl és 1000 µl
4. Vegyszerüvegek
5. Papírkendők és itatóspapír
6. Fedő az ELISA lemezekhez
7. Hulladéktároló a fertőző anyagok számára
8. ELISA kézi- ill. automata mosó mikrotiter lemezekhez
9. Spektrofotométer ELISA lemezekhez, hullámhossz 450 nm, referencia hullámhossz: 620 nm (referenciahullám hossza 620-690nm).
10. Inkubátorszekrény

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által előírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

7.1 Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

A páciensminták tárolhatók 1 hétig 2 és 8°C között.

A pácienshígításokat mindig frissen kell elkészíteni. A hígított betegszérum eltarthatósága maximum 6 óra 2-8°C között.

Hosszabb tároláshoz a szérumokat le kell fagyasztani. A többszöri felolvasztást kerülni kell.

1. Csak friss, nem inaktivált szérumot szabad felhasználni.
2. Hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőzött mintákat, valamint zavaros szérumokat nem szabad felhasználni (hamis pozitív illetve negatív eredmények).

7.2 A reagensek előkészítése

A VIROTECH Diagnostics System Diagnostik nagyfokú rugalmasságot kínál azért, hogy a hígító- és mosópufferek, a TMB és a citrát fixáló (stop) oldat valamint a konjugátum különböző paraméterek mellett és eltérő gyártási tételek esetén is alkalmazhatóak. **A standardszérumok valamint az erős és gyenge pozitív kontrollok kizárólag az alkalmazott teszt készlettel együtt alkalmazhatóak.** Ezért nem szabad őket más sarzsokkal együtt alkalmazni.

1. Állítsa be az inkubátorszekrény hőmérsékletét 37°C-ra és az inkubáció megkezdése előtt bizonyosodjon meg róla, hogy az elérte a beállított hőmérsékletet.
2. Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztcsíkokat tartalmazó csomagot.
3. Minden folyékony komponens jól rázzon fel használat előtt.
4. A mosóoldat-koncentrátumot 1 l-re fel kell tölteni desztillált vagy demineralizált vízzel (ha a koncentrátumban esetleg kristályképződés látható, kérjük az oldatot hígítás előtt szobahőmérsékletre melegíteni, és használat előtt jól felrázni).

7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

1. Pipettázzon ki tesztenként 100 µl felhasználásra kész hígítópuffert (üres minta), a felhasználásra kész standard- és kontrollszérumokat, valamint a hígított betegszérumokat. Minden esetben (üres érték, standardszérumok, kontrolllok,

betegszérumok) javasoljuk hogy két párhuzamos mérést végezzen. Ha a teszt négyparaméteres módszerrel való kiértékeléséhez kalibráláskontrollként a 0,01 IU/ml-es szabványetalon kerül alkalmazásra, akkor ebből kötelezően szükséges egy dupla adag. Munkahígítás betegszérumok esetében: 1+100; pl. 10 µl szérum + 1 ml hígítópuffer.

2. A reagensek kipipettázása után 30 perc 37°C-on történő inkubáció következik (fedő alatt).
3. Az inkubációs idő lejártá után mossa ki a lyukakat 4-szer 350-400 µl mosóoldattal (lyukanként). Mosóoldatot ne hagyjon a lyukakban állni. Papírtörölközőre csepegtesse ki a maradék oldatot.
4. Minden lyukba pipettázzon 100 µl felhasználásra kész konjugátumot.
5. Inkubálja a konjugátumot 30 percig 37°C-on (fedő alatt).
6. A konjugátum inkubálását 4-szeri mosással állítsa le. (ld. 3.pont).
7. Pipettázzon 100 µl felhasználásra kész TMB szubsztrátoldatot minden lyukba.
8. A hordozóoldat inkubációja: 30 perc 37°C-on (lefedve, sötét helyen).
9. Minden lyukba pipettázzon 50 µl citrát fixáló (stop) oldatot, így leállítva a szubsztrátreakciót. Óvatosan kevertesse a lemezt, amíg a folyadékok teljesen összekeverednek és egy egységes sárga szín láthatóvá válik.
10. Mérjen extinkciót 450/620 nm-en (referenciahullám hossza 620-690nm). Állítsa úgy be a fotométert, hogy a mért vak érték a többi extinkciós értékből levonásra kerüljön (nullázza a fotométert az üres értékre). A fotometriás mérést a fixáló (stop) oldat hozzáadása után egy órán belül el kell végezni.

A vizsgálat folyamatábráját ld. az utolsó oldalon

7.4 ELISA-processzor alkalmazása

Valamennyi VIROTECH Diagnostics ELISA termék alkalmas ELISA processzorokkal való használatra. A felhasználó köteles a műszer érvényesítését rendszeresen elvégeztetni.

A VIROTECH Diagnostics a következő eljárást javasolja:

1. Az ELISA processzor üzembehelyezése ill. nagyobb javítása esetén javasoljuk, hogy végeztesse el a készülék hitelesítését a gyártó előírásai szerint.
2. Javasoljuk, hogy az ELISA processzort ellenőrizze a hitelesítő kit (EC250.00) segítségével is. A hitelesítő kittel történő ellenőrzést legalább negyedévenként ajánlott elvégezni.
3. Minden mérési sorozat során meg kell felelni a termék minőségi tanúsítványában szereplő minőségellenőrzési kritériumoknak.

Ez az eljárásmód biztosítja az ELISA processzor kifogástalan működését, és ezen túl a labor minőségbiztosítását is szolgálja.

8. A vizsgálati eredmények kiértékelése

8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése

- a) OD-értékek
Az üres minta OD-értéke <0,15 kell, hogy legyen.
A legalacsonyabb szabványetalon (0,001 IU/ml) OD-értékei a minőség-ellenőrzési bizonyítványban megadott OD-érték felett kell legyenek, és a legmagasabb szabványetalon (0,050 IU/ml) OD-értékei a minőség-ellenőrzési bizonyítványban megadott OD-érték alatt kell legyenek.
- b) A gyenge és erős pozitív kontrollok kimutatott koncentrációinak a minőségi tanúsítványban megadott referenciatartományba (IU/ml) kell esnie.
- c) Ha a követelmények (OD / IU/ml) nem teljesülnek, akkor a tesztet meg kell ismételni.

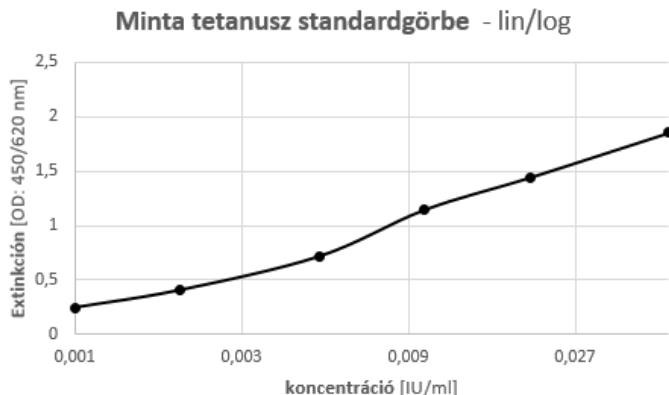
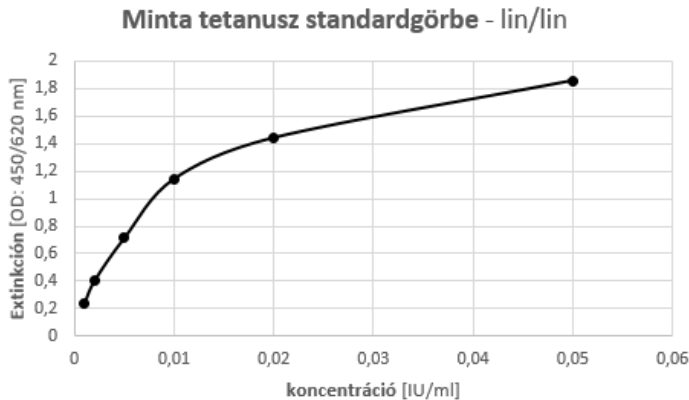
8.2 Kiértékelési szempontok

A készletben található standardok segítségével vegyen fel a mellékelt féllogaritmikus milliméterpapíron egy standard görbét, és használja ezt a szérum tetanusz-antitoxoid IgG antitest tartalmának meghatározásához. A standardgörbe elkészítéséhez vigye fel a kétszer mért standardsorozat extinkciós értékeinek átlagát az ordinátára (Y tengely), a koncentrációértékeket (a felhasznált standardok IU/ml értékei) pedig az abszcisszára (X tengely). Vegye figyelembe, hogy a betegszérumokat a teszt során 1:100 arányban kell hígítani. Ehhez a diagrammról leolvasott eredményt meg kell szorozni 100-zal. A standard görbe létrehozása során a görbe pontról pontra történő megrajzolása és egy 4-paraméteres görbeszámítás között választhat.

Figyelem:

Azon minták, melyek mért NE/ml koncentrációja 0,1 NE/ml alatt van, 1:10 hígításban egy újabb tesztben ismét megmérhetőek. A kiértékelésnél figyelembe kell venni az eltérő hígítást.

Azokat a mintákat, melyek extinkciós értéke a 0,05IU/ml standardénál magasabb, nagyobb (pl. 1:200, 1:400, stb.) hígításban kell a tesztben alkalmazni. Ha az optikai sűrűség értéke 2,00 felett van, a mérési pontosság csökken növekvő optikai sűrűséggel. Ezért ajánlatos az 1:100 arányú hígítás esetén 2,00 feletti optikai sűrűséget elérő szérumokat a teszthez nagyobb hígításban (pl. 1:200, 1:400 stb.) alkalmazni. Az eredmények értékelése során figyelembe kell venni az eltérő hígítási értékeket.



8.3 Interpretáció

A tetanusz antitoxoid-koncentrációt a WHO standardhoz igazodva nemzetközi egységekben (IU/ml) fejezzük ki. >0,1IU/ml tetanusz-antitoxoid IgG antitest tartalmat immunvédelemként (2,11) illetve biztos immunvédelemként (9,10) interpretálunk. 0,5 IU/ml feletti antitestkoncentráció esetén frissítő oltás nem indokolt (10). Az alábbiakban szeretnénk a következő oltásajánlásokra rámutatni. Ezekben az Immunprofilaxis (13) munkaközösség ajánlásaira támaszkodunk:

IU/ml	Értelmezés és további eljárás
< 0,01	- nincs védettség - anamnézis szerint szükséges alapimmunizálás vagy frissítő oltás - szerológiai kontroll 4 - 8 hét múlva
0,01 – 0,1	- védettség bizonytalan - frissítő oltás szükséges - szerológiai kontroll 4 - 8 hét múlva

0,11 – 0,5	- védettség rövid időre még fennáll - frissítő oltás javasolt - frissítő oltás hosszú távú védettséget eredményez
0,51 – 1,0	- védettség fennáll - frissítő oltás vagy 3 év múlva szerológiai kontroll javasolt - Útmutató: > 0,5 IU/ml antitestkoncentráció esetén az oltások nemkívánatos oltási reakciókat eredményezhetnek
> 1,0 – 5,0	- hosszú távú védettség fennáll - frissítő oltás vagy 5 év múlva szerológiai kontroll javasolt
> 5,0 – 10,0	- hosszú távú védettség fennáll - frissítő oltás vagy szerológiai kontroll legkorábban 8 év múlva javasolt
> 10	- hosszú távú védettség fennáll - frissítő oltás vagy szerológiai kontroll legkorábban 10 év múlva javasolt

8.4 A teszt határai

1. A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.
2. A VIROTECH Tetanus ELISA nem alkalmas fertőzés laboratóriumi diagnózisára.
3. Az antitoxoidtiter interpretációjához vegye figyelembe az oltási bizonyítványt, illetve a legutóbbi tetanusz-védőoltásról szóló információkat (7).
4. 0,1IU/ml alatti antitoxoidtiter intepretációja nem javasolt, mivel az az ELISA teszt technikailag reprodukálható érzékenységi határértéke alatt van. Az oltási anamnézist ezért egyedileg kell felállítani annak eldöntésére, hogy alapimmunizálást vagy emlékeztető oltást kell-e alkalmazni.

9. IgG tesztkiértékelés négyparaméteres módszerrel

A VIROTECH tetanusz IgG ELISA használatakor fennáll a négyparaméteres módszerrel való kvantitatív meghatározás lehetősége. A 0,01 IU/ml-es etalon kalibrálási kontrollként szolgál. A kalibrálási kontroll kiegyenlíti a teszt kivitelezés miatti ingadozásokat. A számításhoz az optikai sűrűség (OD, optical density) középértéke kerül használatra.

9.1 Tesztfunkciókontroll

a) OD-értékek

A vakérték OD-értéke <0,15 kell legyen.

A kalibrálási kontroll OD-értéke a minőség-ellenőrzési bizonyítványban megadott tartományon belül kell legyen.

b) IU/ml

A gyengén pozitív kontroll és az erősen pozitív kontroll anti- tetanusz IgG-koncentrációja (IU/ml) a minőség-ellenőrzési bizonyítványban megadott tartományban kell legyen.

Ha ezek a követelmények (OD-értékek, IU/ml) nem teljesülnek, akkor a tesztet meg kell ismételni.

9.2 A kvantitatív eredmények átszámítása milliliterenkénti nemzetközi egységbe (IU/ml)

A vakérték kioltását (450/620 nm) le kell vonni az összes kioltásból.

A páciensszérumok mennyiségi megadása a nemzetközi egységeknek való megfeleltetéssel történik. Nem lineáris regressziót használva, átfogó teszteléssel meghatározásra kerül az alábbi matematikai képlettel (12) leírható standardgörbe:

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

ahol

A:	0 anti- tetanusz IgG koncentráció mellett várható OD
B:	emelkedési tényező
C:	inflexió pont
D:	végtelen magas anti- tetanusz IgG koncentráció mellett várható OD
OD korr:	páciensszérum korrigált OD-értéke

A tesztfeldolgozás során bekövetkező ingadozások figyelembe vétele céljából megtörténik a páciensszérum mért OD-értékének korrigálása kalibrálási kontroll segítségével.

$$OD \text{ korr} = OD \text{ páciensszérum} * \frac{OD \text{ kalibrálási kontroll, előírt érték}}{OD \text{ kalibrálási kontroll, mért érték}}$$

Az A, B, C és D paraméterek értékeit, valamint a kalibrálási kontroll előírt OD-értékét a bizonyítványból kell átvenni. Az ezzel a számítási módszerrel nem kompatibilis kiértékelő szoftver használatához a bizonyítványban még további 6 értékpár definiált, amelyek szintén a standardgörbét írják le.

A kvantitatívan meghatározható tartomány 0,01 IU/ml és 15 IU/ml között van.

Meghatározás IU/ml-ben

Az IU/ml meghatározása a VIROTECH-től beszerezhető szoftverrel történik. Alternatív megoldásként gyors táblázatos számításhoz szükséges kiértékelési módszer is rendelkezésre bocsátható. A számított koncentrációk mindig a hígítatlan szérum tényleges koncentrációját adják meg, ha ez a tesztben 1:100 arányban volt hígítva. Ha a szérum ellenőrzése más hígításban történt, a koncentrációkat ennek megfelelően át kell számolni.

10. Irodalom

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 wissensbasierten Systems bei Fragen der Impfnötigkeit, 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

A betegminták és a mosóoldat előkészítése

▼ **Mosóoldat:** A koncentrátumot hígítsa fel 1 literre desztillált vagy ioncserélt vízzel.

▼ **IgG- minták – hígítás**
1:101

pl.:

10 µl szérum/plazma + 1000 µl hígítópuffer.

(a szérum hígítópuffer felhasználásra kész)

A vizsgálat elvégzése

