

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

Obj. č.: EC124.00

Farebné kódovanie: biele/priezračné

POUŽÍVAŤ LEN PRE DIAGNOSTIKU IN VITRO

**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 použitia	3
2. Princíp testu	3
3. Obsah balenia.....	3
3.1 Testovacia súprava IgG	3
4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie	3
5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia	4
6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)	4
7. Vykonanie testu.....	4
7.1 Vyšetrovaný materiál.....	4
7.2 Príprava reagensí.....	4
7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA	4
7.4 Použitie procesorov ELISA.....	5
8. Vyhodnotenie testu.....	5
8.1 Kontrola fungovania testu.....	5
8.2 Vyhodnotenie.....	5
8.1 Hranice testu.....	7
9. Vyhodnotenie testu IgG 4-parametrovou metódou	7
9.1 Funkčná kontrola testu	7
9.2 Prevod kvantitatívnych výsledkov na medzinárodné jednotky na mililiter (IU/ml).	7
10. Literatúra.....	8
11. Schéma priebehu testu	9

1. Účel použitia

ELISA tetanus slúži kvantitatívnemu dôkazu protilátok IgG proti toxoidu tetanu na kontrolu úspechu očkovania a zistenie stavu zaočkovania.

2. Princíp testu

Protilátka hľadaná v ľudskom sére tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitračnej doske imunitný komplex. Nenaviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neviazané imunoglobulíny sa opäť odstránia premývaním. Po pridaní roztoku substrátu (TMB) vznikne v dôsledku enzymatickej aktivity (peroxidáza) modré farbivo, ktoré po pridaní zastavovacieho roztoku sa premení na žlté.

3. Obsah balenia

3.1 Testovacia súprava IgG

1. **1 mikrotitračná** doska pozostávajúca z 96 odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom,
2. **riediaci pufer PBS** (modrý, pripravený na použitie) 2 x 50 ml, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
3. **premývací roztok PBS** (koncentrovaný 20 x) 50 ml, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a s Tween 20
4. **štandardné séra IgG-Ak** pre štandardnú krivku, 6 fľaštičiek po 2 ml pripravených na použitie, humánne sérum s konzervačným prostriedkom; 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, medzinárodné jednotky).
5. **IgG vysoko pozitívny kontrolný roztok**, 2 ml, humánne sérum s konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie.
6. **IgG slabo pozitívny kontrolný roztok**, 2 ml, humánne sérum s konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie.
7. **IgG konjugát** (antihumánny), 11 ml, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
8. **Tetrametylbenzidín - roztok substrátu** (3,3',5,5'-TMB), 11ml, pripravený na použitie
9. **Zastavovací roztok citrónanu**, 6 ml, obsahuje zmes kyselín

4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie

Testovaciu súpravu uchovávať pri 2-8 °C. Trvanlivosť jednotlivých zložiek je uvedená na príslušných štítkoch, trvanlivosť súpravy pozri na certifikáte kontroly kvality.

10. Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prúžky v uzavretom vrecku s pohlčovačom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneď po použití znovu skladujte pri 2-8 °C.
11. Konjugát pripravený na použitie a roztok substrátu TMB sú citlivé na svetlo a musia sa uchovávať v tme. Ak sa v dôsledku dopadu svetla roztok substrátu sfarbí, musí sa zlikvidovať.
12. Z konjugátu pripraveného na použitie, resp. TMB odoberte len množstvo potrebné pre vykonanie testu. Nadbytok odobratého konjugátu, resp. TMB sa nesmie vrátiť späť, ale musí sa zahodiť.

Materiál	Stav	Skladovanie	Trvanlivosť
Skúšobné vzorky	Zriedené	+2 až +8 °C	max. 6 h
	Nezriedené	+2 až +8 °C	1 týždeň
Kontrolné roztoky	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Mikrotitračná platnička	po otvorení	+2 až +8 °C (skladovanie s dodávaným vakom s hydrofóbnym adsorbentom)	3 mesiace
RF absorbent	nezriedené, po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	Zriedený	+2 až +8 °C	1 týždeň
Konjugát	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Tetrametylbenzidín (TMB)	po otvorení	+2 až +8 °C (chránený pred svetlom)	3 mesiace
Zastavovací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Premývací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	finálne zriedený roztok (pripravený na použitie)	+2 až +25 °C	4 týždne

5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

1. Ako štandardné a kontrolné séra sa používajú len také séra, ktoré boli testované a a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitídy-B boli ohodnotené ako negatívne. Napriek tomu je nutné všetky vzorky, zriedené vzorky, štandardné séra, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitračné prúžky považovať za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatrnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce
2. Zložky, ktoré obsahujú konzervačný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráždivo na pokožku, oči a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneď umyť tečúcou vodou a prípadne vyhľadať lekára.
3. Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Viackanálová pipeta 50 µl, 100 µl
3. Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Skúmavky
5. Rúšok z buničiny
6. Kryt platničiek ELISA
7. Odpadový kontajner pre infekčný materiál
8. Umývačka rúk ELISA a automatická premývačka mikrotitračných platní
9. Spektrofotometer pre mikrotitračné platne so 450/620 nm filtrom (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)
10. Inkubátor

7. Vykonanie testu

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržanie pracovného predpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Vyšetrovaný materiál

Ako skúšobnú vzorku možno použiť sérum a plazmu (druh antikoagulancií tu nehrá úlohu), aj keď v tomto príbalovom letáku sa spomína len sérum.

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia použiť vždy čerstvé.

V prípade dlhšieho uloženia sa séra musia zmraziť. Viacnásobné rozmrazovanie je neprípustné..

1. Používajte len čerstvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
2. Nepoužívajte hyperlipemické, hemolytické, mikrobiálne kontaminované vzorky a zakalené séra (poskytujú nesprávne pozitívne/negatívne výsledky).

7.2 Príprava reagensí

Diagnostický systém VIROTECH Diagnostics poskytuje vysokú mieru flexibility možnosťou použiť riediace a pracie pufré, TMB, zastavovacie roztoky citrónanu ako aj konjugát spôsobom, ktorý presahuje rámec parametrov a šarží. **Štandardné séra ako aj vysoko a slabopozitívne kontrolné roztoky sú určené výlučne pre použitú testovaciu súpravu.** Z tohto dôvodu ich nemožno použiť v iných šaržiach

1. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
2. Všetky reagensie zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími prúžkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potraсте.
4. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentráte tvoria kryštálky, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potraсте).

7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA

1. Pre každú predprípravu testu napipetujte po 100 µl riediaceho pufru pripraveného na použitie (slepý pokus), štandardných a kontrolných roztokov sér, ako aj nariadených sér pacientov. Odporúčame zakaždým dvojčitú sadu vzoriek (blank, štandardné séra, kontrolné roztoky a séra pacientov). Ak sa na vyhodnotenie testu pomocou 4-parametrovej

metódy používa ako kontrola kalibrácie štandard 0,01 IU/ml, vtedy je nutné dvojité použitie. Pracovné nariadenie sér pacientov: 1+100; napr. 10 µl séra + 1 ml riediaceho pufru.

2. Po napipetovaní nasleduje inkubácia 30 min pri 37 °C (s krytom).
3. Inkubačný cyklus ukončíte 4-násobným premývaním, pričom zakaždým použijete 350-400 µl premývacieho roztoku. Premývací roztok nenechajte stáť v jamkách, ale odstráňte jeho posledné zvyšky vyklopaním na buničinový podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Inkubácia konjugátu. 30 min. pri 37 °C (s krytom).
6. Inkubáciu konjugátu ukončíte 4-násobným premytím (pozri bod 3).
7. Napipetujte do každej jamky 100 µl substrátového roztoku TMB, pripraveného na priame použitie.
8. Substrátový roztok inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikrytý, v temnej miestnosti).
9. Reakciu substrátu ukončíte napipetovaním 50 µl zastavovacieho roztoku citrónanu do každej jamky. Dosku opatrne a dôkladne potraсте, až kým sa tekutiny celkom nepremiešajú a kým nie je vidieť jednotné žlté sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpočítala od všetkých ostatných extinkcií. Fotometrické meranie sa musí uskutočniť do jednej hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Pribehovú schému testu pozri na poslednej strane.

7.4 Použitie procesorov ELISA

Všetky testy ELISA firmy VIROTECH Diagnostics sa môžu vykonať pomocou procesorov ELISA. Používateľ je povinný prístroj pravidelne validovať.

VIROTECH Diagnostics odporúča nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. väčších opravách vášho procesora ELISA odporúča firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predlôh výrobcu prístroja.
2. Odporúča sa procesor ELISA následne vyskúšať pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúšanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrt' roka.
3. Pri každom testovacom behu sa musia splniť kritériá pre uvoľnenie do distribúcie uvedené v certifikáte kontroly kvality, ktorý bol vystavený k danému produktu.

Tento postup zabezpečuje bezchybnú funkciu vášho procesoru ELISA a okrem toho slúži k zabezpečeniu kvality laboratória.

8. Vyhodnotenie testu

8.1 Kontrola fungovania testu

- a) Hodnoty OD
Hodnota OD slepého pokusu by mala byť $<0,15$
Hodnoty OD najnižšieho štandardu (0,001 IU/ml) by sa mali pohybovať nad úrovňou OD hodnoty uvedenej v certifikáte kontroly kvality a OD hodnoty najvyššieho štandardu (0,050 IU/ml) by sa mali pohybovať pod úrovňou OD hodnoty uvedenej v certifikáte kontroly kvality.
- b) Stanovená koncentrácia slabo a vysoko pozitívneho kontrolného roztoku by sa mala nachádzať v rámci referenčného rozpätia (IU/ml), ktoré je uvedené v osvedčení kontroly kvality.
- c) Ak požiadavky (OD / IU/ml) nebudú splnené, musí sa test zopakovať.

8.2 Vyhodnotenie

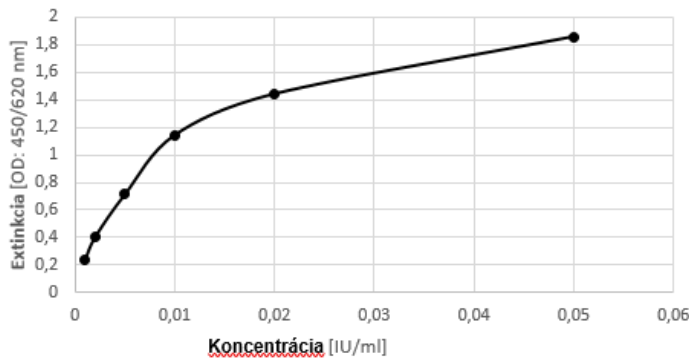
S pomocou priloženého štandardného roztoku sa vyhotoví štandardná krivka pre výpočet obsahu protilátok antitoxoidu tetanu IgG v sére. Za týmto účelom sa zavedú stredné hodnoty extinkcií dvojmo pripojených štandardných sér na ordináte (os Y) a koncentrácie (IU/ml štandardných roztokov pripravených na použitie) na abscise (os X). Je treba mať na pamäti, že séra pacientov pre vykonanie testu musia byť zriedené 1:100. V dôsledku toho sa musí výsledok odčítaný z grafu vynásobiť 100. Pri vyhotovení štandardnej krivky si možno zvoliť buď výpočet krivky bod po bode, alebo aj 4-parametrový výpočet krivky.

Upozornenie:

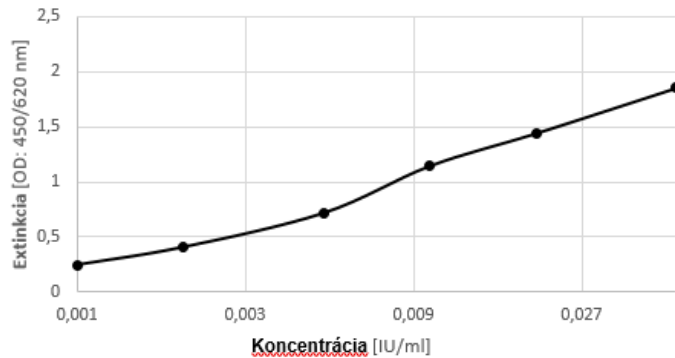
Vzorky, ktorých zistené koncentrácie IU/ml sa nachádzajú pod 0,1 IU/ml, možno pri novej náseade testu zaradiť v zriedení 1:10. Odlišné nariadenie sa musí zohľadniť pri vyhodnotení testu.

Vzorky, ktorých extinkčné hodnoty sú väčšie, ako extinkčné hodnoty štandardu 0,05 IU/ml, sa musia do testu nasadiť vo vyššom nariedení, napr. 1:200, 1:400 atď. Pri hodnotách OD viac ako 2,00 klesá presnosť merania so stúpajúcou optickou hustotou. Preto sa odporúča séra, ktoré dosahujú so zriedením 1:100 hodnoty OD viac ako 2,00, používať v teste vo vyššom zriedení, napr. 1:200, 1:400 atď. Odlišné nariedenia sa musia zohľadniť pri vyhodnotení

Priklad štandardnej krivky tetanu - lin/lin



Priklad štandardnej krivky tetanu - lin/log



8.3 Interpretácia

Koncentrácie tetanového antitoxoidu sa vyjadrujú v zmysle noriem SZO v medzinárodných jednotkách (IU/ml). Obsah protilátok tetanového antitoxoidu IgG >0,1 IU/ml sa považuje za imunitnú ochranu (2,11), resp. spoľahlivú imunitnú ochranu (9, 10). Preočkovania nie sú indikované pri koncentráciách protilátok nad 0,5 IU/ml (10). Následne by sme chceli upozorniť na nasledujúce odporúčania pre očkovanie. Tieto sú vypracované v nadväznosti na odporúčania **pracovnej skupiny imunoprofylaxie (13)**:

IU/ml (medzinárodných jednotiek na ml)	Interpretácia a ďalší postup
< 0,01	- žiadna ochrana očkovaním - v závislosti od anamnézy je potrebná základná imunizácia (<i>prirodzená alebo prvé očkovanie</i>) alebo preočkovanie - sérologická kontrola po 4 až 8 týždňoch
0,01 – 0,1	- ochrana očkovaním neistá - je potrebné preočkovanie - sérologická kontrola po 4 až 8 týždňoch
0,11 – 0,5	- existuje ešte krátkodobá ochrana očkovaním

	- odporúča sa preočkovanie - preočkovanie vedie k dlhodobej ochrane očkovaním
0,51 – 1,0	- ochrana očkovaním existuje - odporúča sa preočkovanie alebo sérologická kontrola po 3 rokoch - Upozornenie: Očkovanie pri koncentrácii protilátok > 0,5 IU/ml môže viesť k nežiaducej reakcii na očkovanie.
> 1,0 – 5,0	- existuje dlhodobá ochrana očkovaním - odporúča sa preočkovanie alebo sérologická kontrola po najskôr 5 rokoch
> 5,0 – 10,0	- existuje dlhodobá ochrana očkovaním - odporúča sa preočkovanie alebo sérologická kontrola po najskôr 8 rokoch
> 10	- existuje dlhodobá ochrana očkovaním - odporúča sa preočkovanie alebo sérologická kontrola po najskôr 10 rokoch

8.1 Hranice testu

1. Interpretácia sérologických výsledkov musí vždy zahrnúť klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne výsledky, ktoré sú k dispozícii.
2. VIROTECH ELISA tetanus nie je vhodný pre laboratórnu diagnózu infekcie.
3. Pri interpretácii titra antitoxoidu je nutné prihliadať na očkovací preukaz, resp. poukaz na posledné ochranné očkovanie proti tetanu. (7)
4. Interpretáciu titrov antitoxoidov pod 0,1 IU/ml nemožno odporúčať, pretože leží pod technicky reprodukovateľnou hranicou citlivosti pri použití testovacieho systému ELISA. Preto je nutné prihliadať v jednotlivých prípadoch na očkovaciu anamnézu, aby sa rozhodlo, či sa má vykonať základná imunizácia alebo iba preočkovanie (⇒ 10.2).

9. Vyhodnotenie testu IgG 4-parametrovou metódou

Test VIROTECH tetanus IgG ELISA umožňuje vykonať kvantitatívne stanovenie pomocou 4-parametrovej metódy. V tomto prípade slúži ako kalibračná kontrola štandardný roztok 0,01 IU/ml. Kalibračná kontrola vyrovnáva odchýlky spôsobené vykonaním testu. Na výpočet sa použijú priemery hodnôt OD (Optical Density = optická hustota)

9.1 Funkčná kontrola testu

a. Hodnoty OD

Hodnota OD slepého pokusu by mala byť <0,15.

Hodnota OD kalibračnej kontroly sa musí nachádzať v rámci rozsahu uvedeného v certifikáte kvality kontroly.

b. IU/ml

Koncentrácie protizáškrtových IgG (IU/ml) slabو pozitívnej kontroly a silno pozitívnej kontroly sa musia nachádzať v rámci rozsahov uvedených v certifikáte kvality kontroly.

Ak požiadavky (hodnoty OD, IU/ml) nie sú splnené, musí sa test zopakovať.

9.2 Prevod kvantitatívnych výsledkov na medzinárodné jednotky na mililiter (IU/ml).

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odčítat' od všetkých extinkcií.

Kvantifikácia patientských sér sa uskutoční prispôbením medzinárodným jednotkám. Rozsiahlymi testovaniami sa nelineárnou regresiou stanoví štandardná krivka a matematicky opíše nasledujúcimi vzorcami (12):

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

kde je:

- A: očakávaná hodnota OD pri koncentrácii protizáškrtových IgG rovnej 0.
B: faktor strmosti
C: bod zvratu

D: očakávaná hodnota OD pri nekonečne vysokej koncentrácii protizáškrtových IgG
kor. OD: korigovaná hodnota OD pacientovho séra

Pre zohľadnenie výkyvov v rámci spracovania testu sa nameraná hodnota OD pacientovho séra koriguje podľa kalibračnej kontroly:

$$\text{OD korr} = \text{OD patientske sérum} * \frac{\text{OD zadaná kalibr. kontrola}}{\text{OD nameraná kalibr. kontrola}}$$

Hodnoty parametrov A, B, C a D, ako aj predbežne zadaná hodnota OD kalibračnej kontroly sú uvedené v certifikáte. Pre vyhodnotenie pomocou softvéru, ktorý nie je kompatibilný s touto výpočtovou metódou, je v certifikáte navyše definovaných 6 hodnotových párov štandardných roztokov, ktoré taktiež opisujú štandardnú krivku.

Kvalifikovateľný rozsah je medzi 0,01 IU/ml a 15 IU/ml.

Stanovenie IU/ml

Stanovenie IU/ml sa môže vykonať pomocou softvéru, dodávaného spoločnosťou VIROTECH. Alternatívne je u výrobcu k dispozícii vyhodnocovacia predloha pre obvyklé tabuľkové výpočty. Vypočítané koncentrácie uvádzajú vždy skutočné koncentrácie nezriedeného séra, keď toto bolo zriedené v teste v pomere 1:100. Ak bolo sérum testované v inom riedení, musia sa koncentrácie príslušne prepočítať.

10. Literatúra

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 wissenschaftsbasierten 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

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

▼ **Premývací roztok:** Koncentrát doplniť na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

▼ **Vzorky IgG – zriedenie**
1:101

napr.
10 µl séra/plazmy + 1000 µl riediaceho pufru
(riediaci pufer séra je pripravený na použitie)

Vykonanie testu

Inkubácia vzoriek

30 minút pri 37 °C

100 µl vzorky pacientov

blank (riediaci pufer), štandardné a kontrolné roztoky

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobré vyklepať

Inkubácia konjugátu

30 minút pri 37 °C

100 µl konjugátu

IgG

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobré vyklepať

Inkubácia substrátu

30 minút pri 37 °C

100 µl substrátu

Zastaviť

50 µl zastavovacieho roztoku

opatrne potriasť

Odmerať extinkciu

Fotometer pri 450/620 nm
(referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)