

**VIROTECH Diphtherie/Diphtheria IgG ELISA
(Diphtherie/Diphtheria IgG ELISA)**

Nr zamówienia: EC129.00

Kod barwny: biały

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 20.3.2019

REV 21 / VIROTECH Diphtherie/Diphtheria IgG ELISA PL

TreŚĆ

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. ZawartoŚĆ opakowania IgG.....	3
4. Przechowywanie i okres trwałoŚci zestawu testowego oraz gotowych do uŹycia odczynników	3
5. Środki ostroŹnoŚci i ostrzeŹnienia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezaŹnaczone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania.....	4
7.1 Materiały do badaŹ.....	4
7.2 Przygotowanie odczynników.....	4
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA	4
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA	5
8. Ocena wyników badania	5
8.1 Kontrola badania	5
8.2 Ocena z 6 standardami	5
8.3 Ocena metodŹ4-parametrowŹ.....	6
8.4 Interpretacja.....	7
8.5 Pomoce do oceny.....	7
8.6 Ograniczenia testu.....	7
9. Literatura	7
10. Schemat przebiegu badania	9

1. Cel zastosowania

Test ELISA służy do ilościowego oznaczenia przeciwciał IgG przeciwko toksynom błonicy w celu kontroli skuteczności szczepienia oraz ustalenia statusu poszczepiennego.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydaza) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania IgG

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 żłamiwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowane
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **Surowice standardowe z przeciwciałami IgG** dla krzywej standardowej, 6 buteleczek po 2 ml, gotowe do użycia, surowica ludzka ze środkami konserwującymi, 0,001IU/ml, 0,002IU/ml, 0,005IU/ml, 0,01IU/ml, 0,02IU/ml, 0,05IU/ml (IU = international units, jednostki międzynarodowe).
5. **IgG kontrola wysoce pozytywna, 2 ml**, surowica ludzka ze środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola słabo pozytywna, 2 ml**, surowica ludzka ze środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
8. **tetrametylobenzydyna i roztwór substratu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gotowy do użycia
9. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszaninę kwasów

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych dołków pozostają pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjść tylko potrzebne do testu ilości gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjńtego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odjęty, lecz należy go usunąć.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrola / Standardy	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzydyna (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Bufor rozcieńczający niebieski	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

1. Jako surowice standardowe i kontrolne stosowane sŃtylko te surowice, które byŃy przebadane i uzyskaŃy wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieŃzione próbki, surowice standardowe, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania naleŃy mimo to traktowaŃ jako materiaŃpotencjalnie zakaŃny i obchodziŃ siŃ z nimi odpowiednio ostroŃnie. ObowiŃzujŃ odpowiednie wytyczne dotyczŃce prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierajŃce Œrodki konserwujŃce, roztwŃr zatrzymujŃcy reakcjŃ na bazie cytrynianu i TMB podraŃniajŃ skŃrŃ, oczy i bŃŃny Œluzowe. W przypadku kontaktu naleŃy natychmiast przemyŃ dane miejsca ciaŃa bieŃŃcŃ wodŃ i ewentualnie pŃjŃ do lekarza.
3. Usuwanie zuŃytych materiaŃw nastŃpuje zgodnie z wytycznymi obowiŃzujŃcymi w danym kraju.

6. MateriaŃy dodatkowe, potrzebne (niezaŃczzone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. pipety wielokanaŃowe 50µl, 100µl
3. mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. probŃwki
5. chusty z masy celulozowej
6. przykrywka pŃŃtek ELISA
7. pojemnik do usuwania materiaŃw zakaŃnych
8. rŃczna pŃŃczka ELISA lub automatyczna pŃŃczka mikropŃŃtek
9. spektrofotometr do odczytu mikropŃŃtek z filtrem 450/620nm (referencyjna dŃŃugoŒŃ fali 620-690nm)
10. inkubator

7. Wykonanie badania

DokŃadne przestrzeganie przepisŃw roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidŃŃwych wynikŃw.

7.1 MateriaŃdo badaŃce

Jako materiaŃbadawczy moŃna zastosowaŃ surowicŃ i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantŃw), nawet jeŒŃi w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

RozcieŃzone próbki od pacjentŃw muszŃbyŃ zawsze ŒwieŒe podczas zastosowania.

W celu dŃŃuŒszego przechowywania surowice muszŃbyŃ zamroŒone. NaleŃy unikaŃ wielokrotnego rozmraŃania.

1. StosowaŃ tylko ŒwieŒe, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosowaŃ probek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mŃŃnych surowic (faŃszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynnikŃw

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duŃy stopieŃelastycznoŒci poprzez moŃliwoŒŃ zastosowania buforu do rozcieŃzania i pŃŃkania, TMB, roztworu zatrzymujŃcego reakcjŃ na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezaleŃnie od parametrŃw i serii. **Surowice standardowe oraz kontrole wysoce i sŃabo pozytywne sŃ przeznaczone wyŃŃcznie do uŃywanego zestawu testowego.** Dlatego nie stosowaŃ w innych szarŃach.

1. UstawiŃ inkubator na temperaturŃ 37°C i przed rozpoczŃciem inkubacji sprawdŃiŃ, czy osiŃgniŃto danŃ temperaturŃ.
2. Wszystkie odczynniki doprowadziŃ do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyŃ opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie pŃŃnne komponenty naleŃy dobrze wymieszaŃ przed uŃyciem.
4. Koncentrat roztworu do pŃŃkania dopeŃniŃ do 1 litra wodŃdestylowanŃdemineralizowanŃ (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu naleŃy przed rozcieŃzeniem doprowadziŃ go do temperatury pokojowej i przed uŃyciem dobrze wstrzŃsŃŃ).

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jednŃprŃbŃ odpipetowaŃ po 100µl gotowego do uŃycia buforu do rozcieŃzania (ŒŃŃpa prŃba), surowic standardowych i kontrolnych oraz rozcieŃzonych surowic pacjentŃw. Zalecamy za kaŃdym razem podwŃjne oznaczenie (ŒŃŃpa prŃba, surowice standardowe, kontrole i surowice pacjentŃw). JeŒŃi do oceny testu metodŃ4-parametrowŃ

- stosowany jest standard 0,01 j.m./ml jako kontrola kalibracji, bezwzględnie konieczne jest podwójne oznaczenie.
- Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10µl surowicy + 1ml buforu do rozcieńczenia.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
 3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne pękanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do pękania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do pękania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
 4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołek.
 5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
 6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne pękanie (patrz pkt 3).
 7. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
 8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
 9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołek dodać pipetami po 50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytki aUpłynę całościowo się wymieszają i widoczny będzie jednorodny żółty kolor.
 10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzenia

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
 2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał
 3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu.
- Takie postępowanie gwarantuje nienaganne działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

8.1 Kontrola badania

- a) Wartości OD (gęstości optycznej)
Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.
Wartości OD najniższego standardu (0,001 j.m./ml) powinny być większe niż wartość OD podana w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD najwyższego standardu (0,050 j.m./ml) powinny być niższe niż wartość OD podana w certyfikacie kontroli jakości.
- b) Ustalone stężenie kontroli słabo i wysoce pozytywnej powinno znajdować się w przedziale referencyjnym podanym w certyfikacie kontroli jakości (IU/ml).
- c) Jeśli wymagania (OD/j.m./ml) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Ocena z 6 standardami

Za pomocą dostarczonych standardów sporządzana jest na załączonym półlogarytmicznym papierze milimetrowym krzywa standardowa do obliczenia zawartości przeciwciał IgG skierowanych przeciw toksynom błonicy w surowicy. W tym celu należy nanieść wartości średnie ekstynkcji podwójnie dostarczonych surowic standardowych na rzędnych (oś y) oraz stężenia (IU/ml) standardów gotowych do użycia na odciętach (oś x). Należy uwzględnić, że surowice pacjentów były rozcieńczone do przeprowadzenia badania w stosunku 1+:100. Z tego powodu konieczne jest pomnożenie odczytanego wyniku z diagramu przez 100.

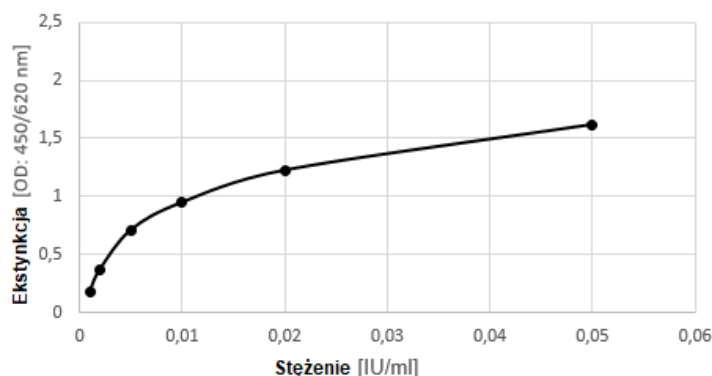
Zakres oznaczalny ilościowo wynosi od 0,1 IU./ml do 5 IU/ml.

Należy uwzględnić:

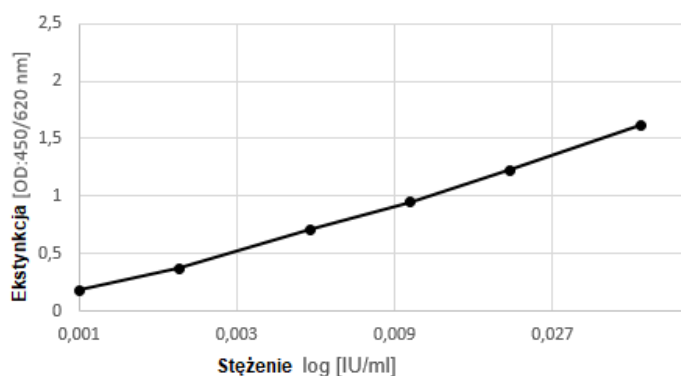
1. Próbkę, których ustalone stężenia w j.m./ml wynoszą poniżej 0,1 j.m./ml, można zastosować podczas ponownej próby testowej z rozcieńczeniem 1:10. Odmienne rozcieńczenie należy uwzględnić podczas oceny.
2. Próbkę, których ustalone stężenia w IU/ml wynoszą powyżej 5 IU/ml, muszą być zastosowane w teście w większym rozcieńczeniu, np. 1+200, 1+400 itd. Odbiegające rozcieńczenie musi być uwzględnione przy ocenie.
3. W przypadku wartości OD powyżej zakresu liniowego (patrz 10.2.4) konieczne jest odpowiednie dopasowanie rozcieńczenia. Odbiegające rozcieńczenia muszą być uwzględnione przy ocenie.

Alternatywnie do 1-3 możliwe jest zastosowanie metody 4-parametrowej.

Przykład krzywej standardowej błonicy - lin/lin



Przykład krzywej standardowej błonicy - lin/log



8.3 Ocena metod 4-parametrowych

Test VIROTECH ELISA Błonica IgG daje możliwość przeprowadzenia oznaczenia ilościowego metodą 4-parametrową. Jako kontrola kalibracji służy tu standard 0,01 IU/ml. Kontrola kalibracji wyrównuje wahania uwarunkowane przeprowadzeniem testu. Do obliczenia stosowane są średnie wartości OD.

W szczegółowych testach dla każdej serii próbek ustalana jest poprzez regresję nieliniową krzywa wzorcowa i opisana matematycznie następującym wzorem (11):

$$\text{j.m./ml} = \exp(-(\ln((D-A)/((OD \text{ kor})-A)-1)-B)/C)$$

Przy czym

A: oczekiwane OD przy stężeniu IgG przeciwko błonicy wynoszącym 0

B: współczynnik nachylenia
 C: punkt przegięcia
 D: oczekiwane OD przy nieskończonym stężeniu IgG przeciwko błonicy
 OD kor: skorygowane OD surowicy pacjenta

W celu uwzględnienia wahań w ramach testu zmierzona wartość OD surowicy pacjenta jest korygowana na podstawie kontroli kalibracyjnej:

$$OD_{kor} = OD_{surowicy\ pacjenta} * \frac{OD_{kontroli\ kalibracyjnej\ wg\ wytycznej}}{OD_{kontroli\ kalibracyjnej\ zmierzonej}}$$

Wartości parametrów A, B, C i D oraz wytyczne dla OD kontroli kalibracyjnej można znaleźć w swoistym dla serii certyfikacie.

8.4 Interpretacja

Stężenia antytoksyny błonicy są wyrażone w oparciu o standard WHO w międzynarodowych jednostkach (IU/ml). Zgodnie z informacjami w piśmiennictwie wystarczająca ochrona poszczepienna jest oczekiwana od 0,1 IU/ml (2,8,9,10). Ta informacja należy jednak postrzegać wyłącznie jako zalecenie!

IU/ml	zalecane szczepienie
< 0,1	- brak ochrony poszczepiennej
0,1 - 0,9	- występuje ochrona poszczepienna - szczepienie przypominające prowadzi do dłużej trwającej ochrony poszczepiennej
>1,0	- występuje długotrwała ochrona poszczepienna - zalecane szczepienie przypominające po 5-10 latach

Zalecenia pokrywają się z informacjami WHO dotyczącymi długotrwałej ochrony poszczepiennej (stężenie przeciwciał >1 IU/ml) (14).

Oznaczenie zawartości przeciwciał IgG przeciw antytoksynom błonicy może być pomocne przy podejmowaniu decyzji odnośnie ustalenia konieczności szczepienia oraz może być również stosowane do serologicznej kontroli szczepienia. Ponadto można otrzymać informacje na temat różnych odczynowości indywidualnego systemu immunologicznego.

8.5 Pomoce do oceny

Ustalenie IU/ml może następować za pomocą oprogramowania do nabycia od firmy VIROTECH Diagnostics. Alternatywnie może być udostępniony szablon do oceny do powszechnie stosowanych arkuszy kalkulacyjnych.

8.6 Ograniczenia testu

1. Test VIROTECH ELISA Błonica nie nadaje do diagnostyki laboratoryjnej zakażenia.
2. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze badania do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
3. W celu interpretacji miana antytoksyn należy powołać się na księżeczkę szczepień lub informacji na temat ostatniego szczepienia ochronnego przeciw błonicy.
4. Interpretacja mian antytoksyn poniżej 0,1 IU/ml nie jest zalecana, ponieważ znajdują się one poniżej technicznie odtwarzalnej granicy wiarygodności przy stosowaniu systemu testów ELISA. W indywidualnym przypadku należy odwołać się do wywiadu dotyczącego szczepień aby zdecydować, czy ma być przeprowadzona immunizacja podstawowa czy szczepienie przypominające.

9. Literatura

1. Epidemiologisches Bulletin, 6/2001
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 i seroepidemiological results of the ÄVittlich Vaccination Studyřĩ Gesundheitswesen 64 (1): 60-4 (2002)
4. Epidemiologisches Bulletin, 19/1999
5. Pachon I, Amela C, De Ory F: Age-specific seroprevalence of poliomyelitis, diphtheria and tetanus antibodies in Spain, Epidemiol Infect 2002, 129 (3): 535-41
6. Ärztezeitung, 23.04.2003; Norddeutsche sind Impfmuffel in Deutschland
7. Gupta RK, Griffin P Jr, Xu J, Rivera R, Thompson C, Siber GR, Diphtheria antitoxin levels in US blood and plasma donors. J Infect Dis 1996, 173 (6) 1493-7
8. Naumann, P., Hagedorn, H.-J. Paatz, R. (1983), Diphtherie-Immunität und ihre epidemiologische Bedeutung, Dtsch. med. Wschr. 108, S. 1090-1096
9. Naumann, P., Paatz, R, und Thomas, L, Diphtherie-Adsorbat-Impfstoff für Erwachsene: Immunologische Wirksamkeit. Die gelben Hefte XXIV (1984), S. 109-115
10. Galazka, A.M., Diphtheria: The Immunological Basis for Immunization Series; WHO/EPI/GEN/93,12; Geneva, pp3
11. 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
12. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015, RKI
13. Epidemiologisches Bulletin 16/2015
14. Weekly epidemiological record, 2006, 81, 21-32, WHO
15. C. Proethko-Müller, R. Schmitz Bundesgesundheitsbl. 2013

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do pękania

Σ **Roztwór do pękania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

Σ **Rozcieńczenie próbki IgG w stosunku 1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczenia

(Roztwór do rozcieńczenia surowicy jest gotowy do użycia)

Wykonanie badania

