

Návod k použití

Tetanus Toxoid IgG ELISA

ELISA test

pro detekci a kvantifikaci lidských protilátek IgG proti **tetanovému toxoidu**
v lidském séru nebo plazmě



Kat. č.: **ILE-TET01**

Skladování: +2 °C až +8 °C

Pouze pro diagnostické použití in-vitro

Únor 2019

IMMUNOLAB GmbH, Otto-Hahn-Str. 16, D-34123 Kassel

Tel: +561 491742-0, Fax: +561 491742-20, e-mail: info@immunolab.de

OBSAH

1	Informace o výrobku	4
2	Úvod	4
3	Princip testu	4
4	Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny.....	5
5	Složení soupravy	6
6	Další potřebné vybavení k provedení testu	8
7	Odběr a skladování vzorků	8
8	Pracovní postup	8
9	Hodnocení výsledků	10
10	Charakteristika soupravy.....	11
11	Literatura	12

Symboly

CAL	Kalibrátor
CONJ	Konjugát
CONC	Koncentrát
SAMP DIL	Ředicí roztok vzorků
STOP	Zastavovací roztok
SUBS	Substrát
MT PLATE	Mikrotitrační destička
WASH BUF	Promývací roztok

1 Informace o výrobku

IMMUNOLAB Tetanus Toxoid IgG je ELISA souprava pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek IgG proti tetanovému toxoidu v lidském séru nebo plazmě. K dostání jsou i další varianty testu určené pro jiné tělní tekutiny a lze si je vyžádat u Technického servisu společnosti IMMUNOLAB.

Sérologický nález je možno interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních laboratorních testů a s klinickým obrazem pacienta.

2 Úvod

Tetanus je onemocnění způsobené toxinem produkovaným bakterií *Clostridium tetani*. Výskyt onemocnění byl celosvětově snížen prostřednictvím zlepšených hygienických podmínek a rozsáhlé profylaxe pomocí očkování. Nicméně každým rokem zemře na tuto infekci 400 000 až 800 000 lidí. Většina těchto osob žije v rozvojových zemích. Ochrana prostřednictvím vakcinace klesá s přibývajícím věkem, protože hladiny tetanového antitoxinu s věkem klesají.

Dostatečná protilátková ochrana je dosažena vakcinací v dětském věku a následnými posilovacími (booster) dávkami. Ochrana začíná na hladině 0,1 IU/ml protitetanového toxoidu.

Očkovací látka zpravidla nevyvolává vedlejší účinky, nicméně se doporučuje detekovat titer protilátek před posilující dávkou očkování. Takto je možné zabránit nežádoucím účinkům u pacienta, jako je lokální otok, bolest a horečka.

Někdy se může vyskytnout selhání imunitní odpovědi u pacientů s normálními nebo vysokými hladinami všech imunoglobulinů a u pacientů s izolovanými imunodeficity. Normální koncentrace imunoglobulinů proto nevyklučují deficit antitetanických protilátek a měla by být testována odpověď na antigenní stimulaci. Pokud je provedeno stanovení protilátek po delší době po primárním a posilovacím (booster) očkování, mohou se vyskytnout abnormality ve výskytu buněčných interakcí a výši stanovených titrů.

3 Princip testu

Souprava IMMUNOLAB Tetanus Toxoid IgG je založena na principu ELISA, typ sandwich. Antigen je navázán na povrchu mikrotitračních jamek. Naředěný vzorek pacienta nebo připravené standardy se pipetují do jamek mikrotitrační destičky. Vzniká vazba mezi IgG protilátkami séra a imobilizovaným antigenem v jamce mikrotitrační destičky. Po jedné hodině inkubace při laboratorní teplotě je destička promyta zředěným promývacím roztokem, čímž se odstraní nenavázaný materiál. Následně se přidá připravený peroxidázový konjugát s obsahem protilátek proti lidskému IgG a inkubuje se 30 minut. Po dalším promytí je pipetován substrát (TMB) a inkubuje se 20 minut, čímž se v jamkách vytvoří modré zbarvení. Vývoj zbarvení se ukončí přidáním zastavovacího roztoku, po němž se barva změní z modré ve žlutou.

Výsledné zbarvení se změří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Koncentrace IgG protilátek je přímo úměrná intenzitě zbarvení.

4 Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny

- Pouze pro použití in vitro! Nepožívejte ani nepolykejte! Je nutné dodržovat místní předpisy týkající se bezpečnosti práce, zákaz jídla, pití a kouření v laboratoři.
- Všechna séra, plazmy a pufry byly testovány všeobecně uznávanými metodami na HbsAg a protilátky proti HIV a HCV a jsou negativní. Přesto je nutné respektovat preventivní opatření, např. používat latexové rukavice.
- Rozlitý vzorek a reagencie je třeba setřít za použití dezinfekčního roztoku (např. 5% chlornanu sodného) a náležitě zneškodnit.
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu (+18 °C až +25 °C).
- Před pipetováním by se všechny reagencie měly důkladně promíchat šetrným nakláněním nebo kýváním lahvičky. Vyhněte se dynamickému třepání, které vede k tvorbě pěny.
- Je důležité pipetovat reagencie ve stejných intervalech, aby ve všech jamkách mikrotitrační destičky byly zajištěny stejné podmínky testu.
- Při dávkování reagencí z lahviček se ujistěte, že nedošlo ke kontaminaci uzávěru. Vyvarujte se možného vzájemného smíchání reagencí. Obsah lahviček je často citlivý vůči oxidaci, proto se musí otevírat pouze na omezenou dobu.
- Aby nedošlo k přenosu nebo křížové kontaminaci, je nutné používat čisté jednorázové špičky na pipety.
- Všechny reagencie se musí spotřebovat do data jejich expirace.
- V souladu se správnou laboratorní praxí (SLP) a normou ISO 9001 by měly být veškeré používané laboratorní přístroje pravidelně kontrolovány z hlediska jejich přesnosti a spolehlivosti. To se týká především mikrotitračních pipet, promývacích a odečítacích zařízení (ELISA Reader).
- Je nutné zabránit kontaktu některých reagencí, především Zastavovacího roztoku a Substrátu, s kůží, očima a sliznicemi, neboť může dojít k jejich podráždění nebo poleptání a hrozí zde riziko intoxikace.

5 Složení soupravy

Mikrotitrační destička potažená antigenem (tetanový toxoid)	1 × 12 stripů
Standard 1 v koncentraci 0 IU/ml	1 × 2 ml
Standard 2 v koncentraci 0,1 IU/ml	1 × 2 ml
Standard 3 v koncentraci 1 IU/ml	1 × 2 ml
Standard 4 v koncentraci 2,5 IU/ml	1 × 2 ml
Standard 5 v koncentraci 5 IU/ml	1 × 2 ml
Konjugát	1 × 15 ml
Substrátový roztok (TMB)	1 × 15 ml
Zastavovací roztok	1 × 15 ml
Ředicí roztok vzorků	1 × 60 ml
Promývací roztok (10krát koncentrovaný roztok)	1 × 60 ml
Plastové fólie	2 ks
Plastový sáček	1 ks

Skladování a stabilita (viz data expirace na štítku krabičky)

Součásti soupravy uchovávejte při teplotě +2 °C až +8 °C. Po použití je nutné destičku opět zabalit, uzávěry lahvíček těsně uzavřít a soupravu uchovávat při teplotě +2 °C až +8 °C. Po otevření je možno soupravu používat tři měsíce.

Univerzální reagentie

Promývací roztok, Substrát (TMB) a Zastavovací roztok jsou stejné ve všech testovacích soupravách pro diagnostiku infekčních nemocnění od společnosti IMMUNOLAB, kde je jako detekční enzym použita peroxidáza. Jsou tedy mezi jednotlivými výrobky a šaržemi zaměnitelné. Všechny ostatní reagentie přísluší ke konkrétní soupravě a šarži a zaměnitelné nejsou!

Mikrotitrační destička

12 stripů, každý s 8 odlamovacími jamkami potaženými antigenem (tetanový toxoid). Připravené k použití.

Standard 1

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující specifické IgG protilátky proti tetanovému toxoidu v koncentraci 0 IU/ml. Roztok obsahuje 0,01 % methylothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Standard 2

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující specifické IgG protilátky proti tetanovému toxoidu v koncentraci 0, 1 IU/ml. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Standard 3

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující specifické IgG protilátky proti tetanovému toxoidu v koncentraci 1 IU/ml. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Standard 4

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující specifické IgG protilátky proti tetanovému toxoidu v koncentraci 2,5 IU/ml. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Standard 5

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující specifické IgG protilátky proti tetanovému toxoidu v koncentraci 5 IU/ml. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Konjugát

15 ml, roztok obsahující králičí imunoglobulin proti lidskému IgG značený křenovou peroxidázou. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu, 0,01 % bromnitrodioxanu a 5 mg/l ProclinuTM. Roztok v pracovním ředění.

Substrát (TMB)

15 ml, Jednosložkový substrátový roztok TMB (tetramethylbenzidin). Roztok v pracovním ředění.

Zastavovací roztok

15 ml, 0,5 M roztok kyseliny sírové. Roztok v pracovním ředění.

Ředicí roztok vzorků

60 ml, Pufr PBS se stabilizátory bílkovin (BSA). Roztok obsahuje 0,095 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

Promývací roztok

60 ml, 10krát koncentrovaný roztok PBS a Tween 20. Pracovní koncentrace: ředíte koncentrovaný Promývací roztok v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát zahřejte na 37°C po dobu 15 minut.

Plastové fólie

2 kusy na překrytí mikrotitračních stripů během inkubace.

Plastový sáček

Opakovaně uzavíratelný obal pro skladování nepoužitých stripů mikrotitrační destičky v suchu.

6 Další potřebné vybavení k provedení testu

Jedno a vícekanálové pipety pro přesné dávkování objemu 5 µl, 100 µl a 500 µl

Špičky pro jednorázové použití

Fotometr pro mikrotitrační destičky (450 nm)

Promývací zařízení

Zkumavky pro ředění vzorků

Deionizovaná voda

7 Odběr a skladování vzorků

Jako vzorek k vyšetření může být použito lidské sérum nebo plazma (EDTA, heparin). Chylózní, hemolytické nebo bakteriálně kontaminované vzorky mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Sérum se po vysrážení a centrifugaci oddělí od krve, která byla sterilně odebrána ze žíly.

Vzorky séra či plazmy se mohou uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně 1 týden. Při delším skladování zmrazte na -20 °C. Vzorky by se neměly opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.

Před provedením testu se musí vzorky (nikoli standardy) naředit v poměru 1:101 Ředícím roztokem vzorků:

Např. 5 µl séra + 500 µl Ředícího roztoku vzorků.

8 Pracovní postup

Pro spolehlivé provedení testu se doporučuje postupovat důsledně podle protokolu. Za veškeré změny a modifikace odpovídá uživatel.

Všechny reagenty a vzorky musí být před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.

Při každém testu by měla být sestrojena kalibrační křivka.

Nepoužijete-li celou destičku, zbylé stripy vraťte zpět do obalu, hermeticky uzavřete a skladujte při +2 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

8.1 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok

Před použitím se naředí v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát se zahřeje na 37 °C po dobu 15 minut.

8.2 Provedení testu

1. Připravte si adekvátní množství jamek mikrotitrační destičky pro standardy, kontroly, vzorky a pro Blank.
 - Nechte jednu jamku prázdnou pro Blank.
 - Pipetujte 100 µl standardů a kontrol **v pracovním ředění**.
 - Pipetujte do jamek 100 µl každého z **ředěných** (1:101) vzorků.
2. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 60 minut při laboratorní teplotě.
3. Odsajte obsah jamek mikrotitrační destičky a přidejte 300 µl zředěného promývacího roztoku do každé jamky. Tento postup se opakuje celkem třikrát. Na závěr vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
4. Dávkujte do každé jamky 100 µl Konjugátu. Nechte jednu jamku prázdnou pro Blank.
5. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
6. Odsajte obsah jamek mikrotitrační destičky a přidejte 300 µl zředěného promývacího roztoku do každé jamky. Tento postup se opakuje celkem třikrát. Na závěr vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
7. Dávkujte do každé jamky 100 µl Substrátu. Tentokrát se pipetuje také do jamky pro Blank.
8. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 20 minut při laboratorní teplotě v temnu (např. v zásuvce).
9. Reakce Substrátu se ukončí přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku do každé jamky. Dávkujte jej také do jamky pro Blank.
10. Po důkladném promíchání a setření dna destičky odečtěte absorbanci při 450 nm (podle uvážení použijte referenční vlnovou délku 620 nm). Vytvořené zbarvení je stabilní nejméně 60 minut.

9 Hodnocení výsledků

Tabulka 1 Orientační hodnoty absorbancí standardů a kontrol před a po odečtení Blanku

	Absorbance před odečtem Blanku	Absorbance po odečtu Blanku
Blank	0,020	
Standard 1	0,043	0,023
Standard 2	0,128	0,108
Standard 3	0,783	0,763
Standard 4	1,635	1,615
Standard 5	2,113	2,093

Poznámka

Výše uvedená tabulka (Tabulka 1) popisuje pouze příklad, který byl dosažen při určité teplotě a podmínkách prostředí. Popsané údaje tedy **nepředstavují referenční hodnoty**, kterých je možné dosáhnout stejným způsobem v jiných laboratořích.

9.1 Kvantitativní hodnocení

Koncentrace protilátek ve standardech, které jsou obsaženy v soupravě Tetanus Toxoid IgG ELISA, jsou definovány a vyjádřeny v mezinárodních jednotkách (IU/ml). Standardy jsou kalibrovány na WHO 1. mezinárodní standard TE-3. Tím je umožněno přesné a reprodukovatelné kvantitativní vyhodnocení. Zároveň jsou pak možné i následné kontroly daného pacienta. Hodnoty standardů v těchto jednotkách jsou uvedeny na štítcích příslušných lahvíček.

Sestrojte kalibrační křivku tak, že na osu X vynesete koncentrace kalibrátorů v IU/ml a na osu Y odpovídající absorbance. Propojením jednotlivých bodů vytvořte kalibrační křivku. Hladinu protilátek ve vzorcích (IU/ml) stanovte odečtením těchto hodnot z kalibrační křivky.

Také je možné využít automatické počítačové programy. Jako proložení křivky je třeba zvolit "point-to-point". Faktor ředění vzorků (1:100) nesmí být k výpočtu zahrnut, jelikož je již obsažen v uvedené koncentraci jednotlivých standardů.

9.2 Interpretace výsledků

Jednotlivé výsledky u vzorků lze interpretovat podle následující tabulky (Tabulka 2).

Tabulka 2 Interpretace výsledků

Hladina protilátek (IU/ml)	Interpretace
menší než 0,01	protilátky jsou negativní: je potřeba základní očkování
0,01 až 0,1	doporučuje se podání posilující očkovací dávky (booster)
0,1 až 1	doporučuje se kontrola titru protilátek v rozmezí 1 až 2 let
1 až 5	doporučuje se kontrola titru protilátek v rozmezí 2 až 4 let
více než 5	doporučuje se kontrola titru protilátek v rozmezí 4 až 8 let

10 Charakteristika soupravy

Tabulka 3 Charakteristika soupravy

Diphtheria Toxoid ELISA	IgG
Intra-assay	6,9 %
Inter-assay	10,4 %
Inter-lot	7,4 až 13,4 %
Analytická citlivost	0,004 IU/ml
Výtěžnost	76 až 107 %
Linearita	77 až 114 %
Zkřížená reaktivita	nebyla pozorována zkřížená reaktivita s <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Interference	nebyly zjištěny interference bilirubinu až do koncentrace 0,3 mg/ml, hemoglobinu až do 8,0 mg/ml a triglyceridů až do 5,0 mg/ml
Klinická specifita	90 %
Klinická senzitivita	90%
Rozsah měření	0,1 až 5 IU/ml

11 Literatura

1. Ambrosch, F. et al. Eine neue Mikro-ELISA-Methode zur Bestimmung der Tetanus-Antikörper. Zbl. Bakteriolog., A258: 173 (1984).
2. Chandler, H.M. et al. A new rapid semi-quantitative enzyme immunoassay for tetanus. J. Infect., 8: 137 (1984).
3. Ehrengut, W. Reaktionen der Wundstarrkrampfpimpfung; Dtsch. Med. Wschr., 95: 1799 (1970).
4. Eisel, U. et al. Tetanus toxin: primary structure, EMBO J., 5: 2495 (1986).
5. Frühwein, N. et al. Bestimmung von Tetanus-Antikörpern im menschlichen Serum mit dem ELISA Test. Ärztl. Labor, 26: 271 (1980).
6. Korger, G. et al. Tetanusimpfung - Verträglichkeit und Vermeidung von Nebenreaktionen. Klin. Wschr., 64: 767 (1986).
7. Melville-Smith, M.E. et al. A comparison of ELISA with the toxin neutralisation test for the estimation of tetanus antitoxin. J. Biol. Standard., 11: 137 (1983).
8. Müller, H.E. et al. Tetanus-Schutzimpfung - Indikation und Kontraindikation. Dtsch. Med. Wschr., 113: 1326 (1988).
9. Schröder, J.P. et al. Serologische Bestimmung von Tetanus-Antitoxin mit einem Enzymimmunoassay. Wehrmed. Mschr., 34: 222 (1990).
10. Schröder, J.P. et al. Tetanusimpfschutz und Vermeidung von Nebenreaktionen bei Auffrischimpfungen. Dtsch. Med. Wschr., 117: 1903 (1992).
11. Sedgwick, A.K. et al. Rapid quantitative microenzyme-linked immuno-sorbent assay for tetanus antibodies. J. Clin. Microbiol., 18: 104 (1983).
12. Zastrow, K.-D. et al. Tetanus - Erkrankungen, Impfungen und Impfschäden in der BRD. Dtsch. Med. Wschr., 118: 1617 (1993).

Souprava je distribuována společností TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

V případě dotazů nás kontaktujte.

Tel: +420 541 248 311

Email: info@testlinecd.cz