



MASTAZYME TETANUS - ANTITOXIN

Enzymatická imunoesej pro detekci a kvantifikaci lidských protilátek IgG
proti tetanickému toxinu v séru a plasmě

Návod k použití

Pouze pro in-vitro diagnostiku



Test	Kód	Kit pro
MASTAZYME Tetanus Antitoxin IgG	681151	12 x 8 testů

Skladujte při 4 – 8 C



Obsah	Strana
1. Použití	3
2. Úvod	3
3. Princip testu	3
4. Součásti soupravy	4
5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	5
6. Upozornění a zvláštní opatření	5
7. Uchovávání a trvanlivost reagensů	6
8. Odběr vzorku	6
9. Pracovní postup	6
10. Interpretace výsledků	7
11. Charakteristika testu	8
12. Literatura	8



1. Použití

Souprava MASTAZYME TETANUS - ANTITOXIN IgG ELISA je určena pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek IgG proti tetanickému toxinu v séru a plasmě.

Na vyžádání je možné test provádět i v dalších tělních tekutinách.

Tento test je určen pouze pro použití in-vitro.

Všechny výsledky testu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními klinickými ukazateli. Pro správnou klinickou interpretaci musí být vzaty v úvahu i výsledky dalších laboratorních testů.

2. Úvod

Tetanus je onemocnění způsobené toxinem bakterie *Clostridium tetani*. Díky zlepšení hygienických podmínek a plošné vakcinaci by výskyt tohoto onemocnění mohl celosvětově poklesnout, přesto ročně zemře 400.000 až 800.000 lidí v důsledku této infekce, převážně lidé žijící v rozvojových zemích.

Imunita proti tetanu má zásadní význam pro většinu činností v běžném i pracovním životě.

Dostatečnou ochranu poskytuje vakcinace a následné pravidelné přeočkování. U starších osob však nemusí být taková ochrana dostačující, jelikož s věkem klesá hladina protilátek.

Hladina protilátek poskytující ochranu proti tetanickému toxinu začíná na hodnotě 0,1 IU/ ml.

Riziko onemocnění je u očkováných lidí velmi nízké a je doporučeno detekovat hladinu protilátek vhodnou metodou před přeočkováním pacienta. Tímto způsobem lze také předcházet zbytečnému vystavení pacienta možným reakcím jako je např. otok a horečka.

Může být pozorována neschopnost odpovědi na jeden nebo více antigenů u některých pacientů s normální nebo vysokou hladinou imunoglobulinů a u imunodeficientních pacientů. Přítomnost normální hladiny imunoglobulinů tedy nevyklučuje deficit protilátek a měla by být testována schopnost imunitní odpovědi.

Pokud se stanovení protilátek provádí po překročení intervalu očkování, můžou se ukazovat abnormality jak v rychlosti poklesu buněčné odpovědi, tak změny ve výši titrů.

3. Princip testu

Princip testu může být popsán ve čtyřech fázích.

3.1 Inkubace séra

Specifické protilátky se váží k antigenům, které jsou na pevné fázi, a tím vzniká stabilní imunokomplex. Po 60-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě jsou jamky promyty předem zředěným promývacím pufrům, čímž se odstraní všechny nereaktivní komponenty v séru.

3.2 Inkubace s konjugátem

Anti-lidský - IgG konjugát s křenovou peroxidázou je přidán do každé jamky.

Konjugát se váže k protilátkám IgG (respektive k antigenu na pevné fázi) a vytváří se tak stabilní „sandwich“. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě je přebytečný konjugát odstraněn promytím každé jamky promývacím pufrům.

3.3 Reakce se substrátem a její zastavení

Do každé jamky je přidán TMB substrát a v reakci mezi ním a enzymem peroxidázou vznikne stabilní modrý chromogen. Reakce s následnou tvorbou zbarvení je zastavena po 20-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě přidáním 0.5 M H₂SO₄ do jamek. Změna pH způsobí, že se modrá barva chromogenu změní na žlutou.

3.4 Vyhodnocení a interpretace

Intenzita zbarvení je vyhodnocena v readeru při 450 nm (doporučená referenční vlnová délka pro bichromatické měření: 600 – 690 nm). Intenzita zbarvení (OD) je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek v séru pacienta.

4. Součásti soupravy

Souprava se skládá z reagensů pro 12 x 8 = 96 stanovení. Mikrotitrační destičky a roztoky musí být skladovány při teplotě 4 – 8 C. Datum expirace je uvedeno na štítku.

12 destiček Mikrotitrační destičky jednotlivé destičky obsahují 8 jamek s navázaným antigenem tetanickým toxinem (*Clostridium tetani*)

1 x Držák

5 x 2 mL Kalibrátory 1 – 5 lidské sérum s obsahem protilátek proti tetanickému toxinu (koncentrace viz tab.) zředěné v PBS a stabilizované 0,01 % methylisothiazolonem a 0,01 % bromonitrodioxanem, připraveny k použití

		IgG
Kalibrátor 1	Koncentrace IU/mL	0
Kalibrátor 2		0,1
Kalibrátor 3		1,0
Kalibrátor 4		2,5
Kalibrátor 5		5,0

1 x 60 mL Sérum diluent roztok PBS/BSA pufrů, obsahuje < 0,1 % azidu sodného jako konzervantu, připraven k použití

1 x 12 mL Roztok HRP konjugátu HRP-značené kozí anti-lidské - IgG protilátky, připraven k použití

1 x 12 mL TMB substrát 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, připraven k použití

1 x 12 mL Stop roztok 0,5 M kyselina sírová, připraven k použití

1 x 60 mL Promývací pufr roztok PBS/Tween pufrů 10x koncentrovaný, naředit 1:10 před použitím, koncentrát může být zahřát až do 37 °C po dobu 15 min. k zabránění vzniku krystalů

2 x	Fólie na přikrytí destiček	na přikrytí mikrotitračních destiček během inkubace
1 x	Plastový obal	znovu-uzavíratelný pro skladování nepoužitých destiček v suchém prostředí

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- 5 µL-, 100 µL- a 500 µL mikro- a multikanálové pipety
- ELISA reader se 450 nm filtrem (referenční filtr 600 – 690 nm)
- Promývač mikrotitračních destiček (v případě manuálního promývání: promývací lahev)
- Zkumavky na ředění sér pacientů
- Odměrný válec
- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality

6. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro in-vitro diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Séra, plasmy a pufry této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami a jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV. Nicméně z preventivních důvodů je nutné při práci používat ochranné latexové rukavice.
- Skvrny způsobené séry či reagensy musí být důkladně odstraněny za použití desinfekčních roztoků (např. 5% chlornan sodný).
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagensy vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24 °C).
- Před použitím je nutné reagensy důkladně, ale jemně promíchat např. krouživými pohyby. Vyhněte se třepání, které vede k následné tvorbě pěny.
- Aby byly zajištěny stejné podmínky testu ve všech jamkách mikrotitrační destičky, je nutné pipetovat reagensy ve stejných intervalech.
- Před použitím reagensů se ujistěte, zda není uzávěr či lahvička poškozena a nedošlo tím k možné kontaminaci. Vyvarujte se vzájemného smíchání reagensů. Protože jsou reagensy často citlivé k oxidaci, je nutné nechávat lahvičky s nimi otevřené pouze po krátkou dobu.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety.
- Není možné míchat či jinak používat reagensy ze stejných souprav o jiné šarži.
- Reagensy nepoužívejte po datu jejich expirace.
- V souladu se Správnou Laboratorní Praxí (SLP) a ISO 9001 by měly být veškeré laboratorní pomůcky a přístroje používané pro provedení testu prověřeny z hlediska přesnosti. Toto se týká především pipet, promývacích a čtecích zařízení (ELISA readerů).



- Vyhněte se kontaktu určitých reagensů, a to především stop roztoku a substrátu, s pokožkou, očima a sliznicemi. Hrozí zde riziko podráždění, poleptání a intoxikace.

7. Uchovávání a trvanlivost reagensů

Všechny reagensie skladujte při teplotě 4 – 8 °C.

Datum expirace každé reagensie je uvedeno na štítku lahvičky. Reagensie nepoužívejte po datu jejich expirace. Naředěný promývací pufr je stabilní až 4 týdny, pokud je skladován při teplotě 4 – 8 °C.

8. Odběr vzorku

Pro stanovení se používá sérum nebo plasma (EDTA, heparin). Sérum je po vysrážení centrifugací odděleno od krve, která byla asepticky odebrána venepunkcí. Vzorky séra či plasmy se skladují při teplotě 4 – 8 °C po dobu max. 48 hodin. Po delší dobu mohou být vzorky skladovány při teplotě -20 °C. Po rozmražení vzorky znovu nezmrazujte. Lipemické, hemolytické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešnou pozitivitu či falešnou negativitu výsledků.

Pacientská séra musí být předředěna sérum diluentem v poměru 1:101 (např. 5 µL séra + 500 µL sérum diluentu).

Vzorky s koncentrací protilátek přesahující hodnotu koncentrace v nejvyšším (nejkoncentrovanějším) kalibrátoru musí být dále zředěny sérum diluentem.

9. Pracovní postup

9.1 Příprava reagensů

Před použitím nechte všechny součásti soupravy a také vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24 °C), reagensie jemně promíchejte.

Promývací pufr: Rozpusťte krystalky, které se mohou v lahvičce vyskytovat, zahřátím na teplotu 37 °C, a poté jemně promíchejte.

Nařed'te koncentrovaný promývací pufr v poměru 1:10 destilovanou vodou (např. 60 mL koncentrovaného pufru + 540 mL destilované vody). Důkladně promíchejte.

- Pro správné provedení testu je nutné důsledně postupovat podle přiložených instrukcí. Veškeré změny a modifikace jsou v rámci odpovědnosti uživatele.
- Všechny reagensie a vzorky musí být před použitím při pokojové teplotě, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.
- Kalibrační křivka by měla být sestrojena při každém testu.
- Nepoužité mikrotitrační destičky vložte zpět do plastového obalu a uchovávejte je v suchu při teplotě 4 – 8 °C.

9.2 Provedení testu

Připravte si dostatečné množství jamek v mikrotitračních destičkách pro kalibrátory, kontroly a vzorky.

Poznámka: Je možné využít i jiné inkubační podmínky. V případě změn v doporučeném pracovním postupu (např. inkubace při teplotě 37 °C místo pokojové teploty) musí uživatel validovat takovéto provedení testu.

1. Pipetujte **100 µL naředěného** vzorku (1:101) a kalibrátorů do příslušných jamek.
2. Překryjte destičku fólií na překrývání destiček a **inkubujte** při pokojové teplotě po dobu **60-ti minut**.
3. **Odstraňte** přebytečný obsah z mikrojamek a **3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru**. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
4. Pipetujte **100 µL roztoku HRP konjugátu** do každé jamky.
5. Překryjte destičku fólií na překrývání destiček a **inkubujte** při pokojové teplotě po dobu **30-ti minut**.
6. **Odstraňte** přebytečný obsah z mikrojamek a **3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru**. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
7. Pipetujte **100 µL TMB substrátu** do každé jamky.
8. Překryjte destičku fólií na překrývání destiček a **inkubujte** po dobu **20 minut** ve tmě při pokojové teplotě.
9. Přidejte **100 µL stop roztoku** do každé jamky.
10. Po důkladném promíchání a vysušení dna mikrojamek **změřte optickou hustotu při 450 nm** a vypočítejte výsledky. Blank měřte proti vzduchu. Je doporučeno bichromatické měření za využití referenčních vlnových délek 600 – 690 nm.

Vytvořené zbarvení je stabilní alespoň 60 minut. Měřte optické hustoty během této doby.

10. Interpretace výsledků

Příklad

	OD 450 nm	upravená OD	střední hodnota OD
Blank	0,020		
Kalibrátor 1	0,043 / 0,041	0,023 / 0,021	0,022
Kalibrátor 2	0,128 / 0,124	0,108 / 0,104	0,104
Kalibrátor 3	0,783 / 0,789	0,763 / 0,769	0,766
Kalibrátor 4	1,635 / 1,611	1,615 / 1,591	1,603
Kalibrátor 5	2,113 / 2,129	2,093 / 2,109	2,102



Výše uvedená data v tabulce mohou být považována za příklad, který byl dosažen při určité teplotě a okolních podmínkách. Tato data nepopisují referenční hodnoty, kterých je možné dosáhnout v různých laboratořích stejným způsobem.

10.2 Kvantitativní hodnocení

V soupravě obsažené kalibrátory jsou připraveny k použití a koncentrace protilátek jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách (U/mL). Kalibrátory byly kalibrovány podle doporučení WHO dle WHO 76/589. Hodnoty koncentrací pro jednotlivé kalibrátory jsou uvedeny na štítcích příslušných lahvíček.

Kalibrační křivka může být sestrojena na milimetrovém papíře vynesemím středních hodnot absorbancí kalibrátorů na osu y a odpovídajících hodnot jejich koncentrací na osu x. Následně mohou být koncentrace protilátek v séru pacienta odečítány přímo z takového grafického zobrazení.

Výpočet výsledků může být také proveden za využití počítače s odpovídajícím softwarem.

Výsledky hodnot IgG jsou hodnoceny podle následující tabulky:

< 0,1 IU / mL	doporučená vakcinace
0,1 - 1,0 IU / mL	kontrola za 1 - 2 roky
1,0 - 5,0 IU / mL	kontrola za 2 - 4 roky
> 5,0 IU / mL	kontrola za 4 - 8 roky

11. Charakteristika testu

Charakteristiky ELISA testu MASTAZYME TETANUS –ANTITOXIN IgG byly stanoveny a posouzeny v souladu s Evropskými IVD direktivami. Detailní validační data mohou být poskytnuta na zvláštní přání

12. Literatura

1. Ambrosch F et al. Eine neue Mikro-ELISA-Methode zur Bestimmung der Tetanus-Antikörper. Zbl. Bakteriol. A258: 173 (1984).
2. Chandler HM et al. A new rapid semi-quantitative enzyme immunoassay for tetanus. J. Infect. (1972) 8: 137
3. Ehrengut W. Reaktionen der Wundstarrkrampfimpfung; 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 ME 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 HE. et al. Tetanus-Schutzimpfung - Indikation und Kontraindikation. Dtsch. Med. Wschr., 113: 1326 (1988).
9. Schröder JP et al. Serologische Bestimmung von Tetanus-Antitoxin mit einem Enzymimmuno- assay. Wehrmed. Mschr. 34: 222 (1990).
10. Schröder JP et al. Tetanusimpfschutz und Vermeidung von Nebenreaktionen bei Auffrisch- impfungen. Dtsch. Med. Wschr. 117: 1903 (1992).
11. Sedgwick AK et al. Rapid quantitative microenzyme-linked immunosorbent 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).