



virion\serion

Hersteller
Manufacturer
Fabricant
Fabbricante
Производитель

Institut Virion\Serion GmbH
Институт Вирион\Серион ООО

Friedrich-Bergius-Ring 19
Кольцевая ул. Фридриха Бергиуса 19

D - 97076 Würzburg, Germany
D - 97076 Вюрцбург, Германия
Telefon/Телефон: +49 (0) 9 31 / 30 45 0
Fax/Факс: +49 (0) 9 31 / 30 45 100

E-Mail/Эл. почта: dialog@virion-serion.de
Internet/Интернет: www.virion-serion.de

SERION ELISA classic Diphtherie / Diphtheria IgG

YOUR
GLOBAL
PARTNER
IN
DIAGNOSTICS



virion\serion

SERION ELISA *classic*

Diphtherie / Diphtheria IgG



Gebrauchsanweisung - Deutsch
Instructions - English
Mode d'emploi - Français
Istruzioni per l'uso - Italiano
Инструкция по применению – русский язык

(Version/Versione/версия 9.10/01-1)

Aktualisierungen

Bitte beachten Sie die Änderungen im Vergleich zur Vorversion.

Versionsnummer: V 9.10/01-1

Vorhergehende Version: V 8.04/12-1

Änderung in Kapitel: generelle Überarbeitung +7.2.1

SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG

INHALTSVERZEICHNIS

- 1 ANWENDUNGSBEREICH**
- 2 DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG**
- 3 TESTPRINZIP SERION ELISA *classic***
- 4 INHALT UND ZUSAMMENSETZUNG**
- 5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN**
- 6 LAGERUNG UND HALTBARKEIT**
- 7 DURCHFÜHRUNG DES SERION ELISA *classic***
 - 7.1 Allgemeine Hinweise
 - 7.2 Probenvorbereitung und Lagerung
 - 7.3 Reagenzienvorbereitung
 - 7.4 Übersicht - Testablauf
 - 7.5 Manuelle Testdurchführung
 - 7.6 Automatische Testdurchführung
 - 7.7 Positivkontrolle / Richtigkeitskontrolle
- 8 TESTAUSWERTUNG**
 - 8.1 Ein-Punkt-Quantifizierung nach der 4PL-Methode
 - 8.2 Testgültigkeitskriterien
 - 8.3 Auswertung SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG
 - 8.4 Quantifizierungsgrenzen
 - 8.5 Interpretation der Ergebnisse
 - 8.6 Referenzbereiche gesunder Probanden
- 9 LEISTUNGSMERKMALE**
 - 9.1 Sensitivität und Spezifität
 - 9.2 Präzision
- 10 SICHERHEITSMASSNAHMEN**
 - 10.1 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen
 - 10.2 Entsorgung
- 11 LITERATUR**



SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von humanen Antikörpern für die *in vitro*-Diagnostik

SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG

Best.-Nr.: ESR130G

1 ANWENDUNGSBEREICH

Der SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG ist ein qualitativer und quantitativer Immunoassay für den Nachweis von humanen Antikörpern in Serum oder Plasma gegen das Diphtherietoxin. Der Test dient zur Bestimmung des Anti-Diphtherietoxin Titers, zur Kontrolle des Impferfolges sowie zur Bestimmung des Immunstatus vor der Immunisierung zur Vermeidung von Impfschäden.

2 DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

Corynebacterium diphtheriae ist der Erreger der Diphtherie. Für die humanpathogene Virulenz ist das Diphtherietoxin des Erregers verantwortlich. In Westeuropa wurde in der letzten Zeit auch das zoonotisch übertragbare *Corynebacterium ulcerans* bei klinischen Diphtheriefällen isoliert.

Die Diphtherie ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit. Sie wird durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen. Die Mehrzahl der Erkrankungen tritt in gemäßigten Klimazonen mit jahreszeitlichen Schwankungen zwischen November und Februar auf. Die Inkubationszeit beträgt normalerweise zwei bis fünf Tage. Die klinische Symptomatik betrifft in gemäßigten Klimaregionen hauptsächlich den Respirationstrakt. Eine Primärinfektion kann sich in der Tonsillopharyngeal-Region manifestieren oder stufenweise eine laryngeale, nasale oder tracheobronchiale Infektion auslösen. Zu den wichtigsten Komplikationen gehören Myokarditis und Polyneuritis. Die Letalität der Diphtherie Erkrankung liegt bei 5 bis 25 %. Sie tritt in Folge einer Atemwegsobstruktion oder eines Herzversagens ein.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts war die Diphtherie in Europa eine der häufigsten Todesursachen von Kindern in Europa. Durch Impfkampagnen hat sich die Inzidenz der Erkrankung bis in die 1990er Jahre drastisch vermindert. In Russland und in anderen osteuropäischen Ländern kam es nach dem Zusammenbruch der Sowjetunion zu einer Diphtherie-Epidemie, da eine hohe Durchimpfungsrate nicht mehr gegeben war. Trotz mittlerweile deutlich angestiegener Impfquoten bei Kindern und Jugendlichen ist die durch Diphtherie verursachte Mortalität in diesen Ländern immer noch vergleichsweise hoch, da ungeimpfte Personen von hohen Impfquoten weniger stark profitieren als bei anderen impfpräventablen Erkrankungen und Diphtherietoxin Antikörper nicht gegen die Besiedlung durch Corynebakterien schützen.

Der ausschließlich bakteriologische Nachweis ist nicht aussagekräftig, da häufig apathogene saprophytäre Corynebakterien im menschlichen Mund- und Rachenraum nachge-

wiesen werden können. Zur Differentialdiagnose muss ein Toxinnachweis durchgeführt werden.

Aus historischen Gründen wurde zur quantitativen Bestimmung von Diphtherie-Antitoxin in Seren ein passiver Hämagglutinationstest eingesetzt. Die Angaben erfolgten in Internationalen Einheiten pro Milliliter (IU/ml). Auf Grund ihrer Standardisier- und Automatisierbarkeit werden heute moderne ELISA-Verfahren eingesetzt. In Anpassung an internationale Referenzseren erfolgt die Angabe des Anti-Diphtherietoxin Titers ebenfalls in IU/ml.

Die Bestimmung des Immunstatus vor Impfungen zur Vermeidung von Hyperimmunisierungen nimmt in den Routinelaboratorien der industrialisierten Länder eine zunehmend wichtige Stellung ein. Andererseits wurden in den letzten Jahren Studien veröffentlicht, die besonders unter der erwachsenen Bevölkerung oft eine mangelnde Immunität gegen das Diphtherietoxin dokumentieren. Die serologische Bestimmung des Anti-Diphtherietoxin IgG Titers kann hier gegebenenfalls wichtige Argumente für die Notwendigkeit einer Impfung liefern.

3 TESTPRINZIP SERION ELISA *classic*

Der ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ist ein immunologisches Verfahren, das sich insbesondere in der Infektionsserologie zur Erfassung von Antikörpern bewährt hat. Die Nachweisreaktion basiert auf der spezifischen Interaktion von Antikörpern und Antigenen. Zu diesem Zweck wurden die Teststreifen der Mikrotiterplatten des SERION ELISA *classic* mit spezifischen Antigenen von Infektionserregern zur Bindung der in der Patientenprobe vorhandenen Antikörper beschichtet. Weitere, mit Alkalischer Phosphatase markierte Sekundärantikörper detektieren die so gebildeten Immunkomplexe. Das Enzym katalysiert eine Reaktion, in deren Verlauf das farblose Substrat p-Nitrophenylphosphat in das farbige Produkt p-Nitrophenol umgewandelt wird. Die Signalstärke des Reaktionsprodukts ist proportional zur Antikörperkonzentration in der Probe und wird photometrisch erfasst.

4 INHALT UND ZUSAMMENSETZUNG

Testkomponenten	Stück / Volumen
Brechbare Mikrotiterstreifen mit je acht antigenbeschichteten Einzelkavitäten (insg. 96) [MTP] , 1 Testrahmen. Das Beschichtungsmaterial ist inaktiviert.	12 Stück
Standardserum (gebrauchsfertig) [STD] , Humanserum in proteinhaltigem Phosphatpuffer; negativ getestet für anti-HIV-Ak, HBs-Ag (Hepatitis B-Virus-surface Antigen) und anti-HCV-Ak; Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid; Farbstoff: Amaranth O.	2 x 2 ml
Negatives Kontrollserum (gebrauchsfertig) [NEG] , Humanserum in proteinhaltigem Phosphatpuffer; negativ getestet für anti-HIV-Ak, HBs-Ag (Hepatitis B-Virus-surface Antigen) und anti-HCV-Ak; Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid; Farbstoff: Lissamin-Grün V.	2 ml
Anti-Human IgA, IgG oder IgM Konjugat (gebrauchsfertig) [APC] , Gegen humanes IgG, IgA oder IgM gerichteter, polyklonaler Antikörper, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, stabilisiert in proteinhaltiger Lösung; Konservierungsmittel: 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromnitrodioxan.	13 ml
Waschlösungskonzentrat (ausreichend für 1000 ml) [WASH] , Natriumchlorid Lösung mit Tween 20 und 30 mM Tris/HCl, pH 7,4; Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid.	33,3 ml
Verdünnungspuffer [DILB] , Proteinhaltiger Phosphatpuffer mit Tween 20; Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid; Farbstoff: 0,01 g/l Bromphenolblau.	2 x 50 ml
Stopplösung [STOP] , 1,2 N Natronlauge.	15 ml
Substrat (gebrauchsfertig) [pNPP] , Para-Nitrophenylphosphat in lösungsmittelfreiem Puffer; Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid. (Eine leichte Gelbfärbung des ungeöffneten Substrats ist möglich. Hieraus ergibt sich keine Qualitätsminderung!)	13 ml
Qualitätskontrollzertifikat mit Standardkurve und Wertetabelle [INFO] , (Quantifizierung der Antikörper in IU/ml bzw. U/ml).	2 Stück

5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Übliche Laborausrüstung
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit Filter, Wellenlänge 405 nm, empfohlene Referenzwellenlänge im Bereich von 620 nm - 690 nm (z. B. 650 nm)
- Inkubator 37 °C
- feuchte Kammer
- *Aqua dest.*
- Click-Clips (Best.-Nr. VT120)

6 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Reagenz	Lagerung	Haltbarkeit
Mikrotiterstreifen (mit Antigen beschichtet)	ungeöffnet nach Anbruch bei 2 – 8 °C in Gegenwart von Trockenmittel und wieder verschlossen gelagert <i>Die unbenutzten Kavitäten sollen trocken und luftdicht im verschlossenen Aluminiumbeutel gelagert werden.</i>	bis Verfallsdatum; Mindesthaltbarkeit: 4 Wochen; Haltbarkeit bei sachgerechter Lagerung: bis zum Verfallsdatum
Kontrollseren / Standardseren	nach Anbruch bei 2 – 8 °C	bis Verfallsdatum; 24 Monate ab Herstellungsdatum
Konjugat	Gebrauchsfertige Lösung bei 2 – 8 °C <i>Kontaminationen sind u. a. durch den Gebrauch steriler Pipettenspitzen unbedingt zu vermeiden.</i>	bis Verfallsdatum; 28 Monate ab Herstellungsdatum
Verdünnungspuffer	ungeöffnet nach Anbruch bei 2 – 8 °C <i>Eingetrübte Lösungen bitte verwerfen.</i>	bis Verfallsdatum; 36 Monate ab Herstellungsdatum 24 Monate
Waschlösung	Konzentrat nach Anbruch bei 2 – 8 °C Gebrauchsverdünnung bei 2 – 8 °C Gebrauchsverdünnung bei Raumtemperatur <i>Behälter für Gebrauchsverdünnung regelmäßig reinigen! Eingetrübte Lösungen bitte verwerfen.</i>	bis Verfallsdatum; 2 Wochen; 1 Woche
Substrat	gebrauchsfertige Lösung bei 2 – 8 °C, lichtgeschützt gelagert <i>Kontaminationen sind u. a. durch den Gebrauch steriler Pipettenspitzen unbedingt zu vermeiden. Bei stärkerer Gelbfärbung (Extinktion gegen Aqua dest. > 0,25 OD) bitte verwerfen.</i>	bis Verfallsdatum; 36 Monate ab Herstellungsdatum
Stopplösung	nach Öffnung bei Raumtemperatur	bis Verfallsdatum

7 DURCHFÜHRUNG DES SERION ELISA *classic*

7.1 Allgemeine Hinweise

Für die sachgemäße Anwendung der SERION ELISA *classic* sind ausschließlich die SERION ELISA *classic* Komponenten zu verwenden. Letztere können nicht durch Reagenzien anderer Hersteller ersetzt werden. Die Standard- und Kontrollseren der SERION ELISA *classic* sind chargenspezifisch für jeden Testkit optimal eingestellt und können nicht in anderen Chargen eingesetzt werden. Verdünnungspuffer, Waschlösung, Substratlösung und Stopplösung können mit allen SERION ELISA *classic* chargen- und kitunabhängig angewendet werden.

Für jede Immunglobulinklasse gibt es drei verschiedene Konjugatkonzentrationen: NIEDRIG-, MITTEL- und HOCH-KONZENTRIERT. Die Einstufung der Konjugate erfolgt durch folgende Kennzeichnung auf dem Etikett:

z.B.	IgG +	niedrig-konzentriertes IgG Konjugat
	IgG ++	mittel-konzentriertes IgG Konjugat
	IgG +++	hoch-konzentriertes IgG Konjugat

Um die hohe Qualität unserer SERION ELISA *classic* zu gewährleisten, ist in seltenen Fällen der Einsatz von Sonderkonjugaten notwendig. Diese haben eine Sondercharge und sind nicht mit Symbol "+" gekennzeichnet. Sonderkonjugate sind nicht gegen andere Konjugate austauschbar.

Bitte beachten Sie immer die Beschriftung der Etiketten!

Unter Voraussetzung einer sachgerechten Lagerung sind alle Komponenten des SERION ELISA *classic* ungeöffnet bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar. Die Reagenzien sollen nicht über das Verfallsdatum hinaus benutzt werden.

Die unsachgemäße Verdünnung der Reagenzien kann zum Verlust an Nachweisempfindlichkeit führen.

Die Testreagenzien sollen während der Lagerung und Inkubation vor hellem Licht geschützt werden. Nach Gebrauch sind die Komponenten gut zu verschließen, um deren Austrocknung und Kontamination zu vermeiden.

Der Verschlussbeutel für die Kavitäten der Mikrotiterplatte soll nur an der Schweißnaht aufgeschnitten werden, um ein Wiederverschließen zu gewährleisten. Bei Beschädigung sowie nach unsachgemäßem Verschließen des Verschlussbeutels zur Aufbewahrung der nicht benutzten Kavitäten sollen die Mikrotiterstreifen nicht mehr verwendet werden.

Um Kontamination zu vermeiden, sollten immer aseptische Techniken zur Entnahme von Reagenzienaliquots angewendet werden. Zur Vermeidung verfälschter Ergebnisse darf die Pipettenspitze bei der Konjugatpipettierung keinesfalls den oberen Rand der Kavitäten berühren und benetzen. Beim Verschließen der Fläschchen ist darauf zu achten, wieder den entsprechenden, zur Flasche gehörenden Deckel einzusetzen.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist u. a. von der sorgfältigen Mischung der angesetzten Reagenzien abhängig. Aus diesem Grund sollen die Behältnisse von Kontrollseren und Konjugaten vor Entnahme gut geschüttelt werden. Auch die Probenverdünnungen sollen vor dem ersten Pipettierschritt mit einem Monomixer (z. B. Vortex) gut durchmischt werden.

Weiterhin ist auf eine sorgfältige Pipettierung und die Einhaltung der vorgegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen zu achten. Große Zeitdifferenzen zwischen der Pipettierung der ersten und der letzten Kavität bei der Zugabe von Proben- und Kontrollseren, Konjugat und Substrat führen zu unterschiedlichen Inkubationszeiten, welche die Präzision und Reproduzierbarkeit der Messwerte beeinflussen können.

Nur die strikte Einhaltung der Arbeitsvorschrift gewährleistet korrekte Ergebnisse.

Der SERION ELISA *classic* kann nur ausgewertet werden, wenn die chargenspezifischen Validitätswerte des im Kit enthaltenen Qualitätskontrollzertifikates erfüllt wurden.

Korrektes Waschen verhindert Testunspezifitäten. Aus diesem Grund sollten die Gebrauchsanleitungen der verwendeten Waschgeräte befolgt werden. Wichtig sind die gleichmäßige Befüllung der Kavitäten der Flachbodenplatten mit Waschlösung und deren vollständige Entfernung, um unkontrollierbare Verdünnungseffekte auszuschließen. Schaumbildung ist in jedem Fall zu vermeiden!

Die Beschriftung der Mikrotiterstreifen mit Kürzeln von Erreger und Antikörperklasse sollte nicht zerkratzt werden, um ein Verwechseln zu vermeiden.

7.2 Probenvorbereitung und Lagerung

Lipämische, hämolytische sowie ikterische Proben (Serum oder Plasma) sollten nur unter Vorbehalt eingesetzt werden. Bakteriell kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Geeignete Untersuchungsmaterialien sind nach Standardlabortechniken gewonnene Seren oder Plasmen (EDTA, Citrat, Heparin). Die Proben dürfen nicht thermisch inaktiviert werden.

7.2.1 Probenverdünnung

Vor Testbeginn die Proben (V_1) in Verdünnungspuffer (V_2) verdünnen:

$V_1 + V_2 = 1 + 100$	je	10 μl	Patientenprobe
	zu je	1000 μl	Verdünnungspuffer

Die Messgenauigkeit nimmt bei OD-Werten von über 2,000 mit steigender optischer Dichte zunehmend ab. Es wird deshalb empfohlen, die Seren zusätzlich in einer 1 + 1000 Verdünnung zu testen, wenn der OD-Wert bei einer 1+100 Verdünnung über 2,000 liegt. Dieses Verfahren sichert die Ermittlung exakter IU/ml-Werte auch bei Seren mit höherem Antikörpergehalt.

Beim Vorliegen eines entsprechenden Patientenmaterials kann primär die 1+1000 Verdünnung eingesetzt werden. Für die sichere Diagnose im unteren Antikörperbereich sind dann alle Seren mit einem Gehalt unter 1 IU/ml in einer 1+100 Verdünnung erneut zu prüfen.

$V_1 + V_2 = 1 + 1000$	je	10 μl	Patientenprobe
	zu je	1000 μl	Verdünnungspuffer (= 1 + 100)
		20 μl	aus der ersten Verdünnung
	zu je	180 μl	Verdünnungspuffer (= 1 + 9)

Nach jeder Verdünnung und vor dem Pipettierschritt sollten die Proben mit einem Monomixer (z. B. Vortex) gut durchmischt werden, um eine homogene Lösung herzustellen.

7.2.2 Probenlagerung

Die Patientenproben sollten nicht länger als 7 Tage bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist bei ≤ -20 °C möglich. Mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren soll vermieden werden. Verdünnte Proben können bei 2 – 8 °C eine Woche aufbewahrt werden.

7.3 Reagenzienvorbereitung

Alle Testreagenzien müssen vor dem Testansatz auf Raumtemperatur erwärmt werden.

7.3.1 Mikrotiterstreifen

Die Teststreifen bzw. Kavitäten sind zusammen mit einem Trockenmittel verpackt. Nicht benötigte Teststreifen bzw. Kavitäten sollten wieder mit dem Trockenmittel im Aluminiumbeutel luftdicht eingeschlossen werden.

7.3.2 Kontrollseren / Standardseren

Kontroll- und Standardseren sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden. Bei jedem Testlauf müssen unabhängig von der Anzahl der eingesetzten Teststreifen Kontrollseren in Einfach-, Standardseren in Doppelbestimmung mitgeführt werden.

7.3.3 Anti-Human IgA, IgG bzw. IgM AP-Konjugat (gebrauchsfertig)

Konjugate sind innerhalb der jeweiligen Konjugatkonzentration und Immunglobulinklasse austauschbar. Kontaminationen der gebrauchsfertigen Konjugate sind u. a. durch den Gebrauch steriler Pipettenspitzen unbedingt zu vermeiden.

7.3.4 Waschlösung

Das Waschlösungskonzentrat (V_1) ist im Verhältnis 1:30 mit *Aqua dest.* auf ein Endvolumen (V_2) zu verdünnen.

Beispiel:

Waschlösungskonzentrat (V_1)	Endvolumen (V_2)
33,3 ml	1000 ml
1,0 ml	30 ml

7.3.5 Verdünnungspuffer für Proben (gebrauchsfertig)

7.3.6 Substrat (gebrauchsfertig)

Kontaminationen der gebrauchsfertigen Substratlösung sind u. a. durch den Gebrauch steriler Pipettenspitzen unbedingt zu vermeiden.

7.3.7 Stopplösung (gebrauchsfertig)

7.4 Übersicht - Testablauf

SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG quantitativ

Probenverdünnung¹
(Patientenproben)
1 + 100

Zugabe der verdünnten Proben und der
gebrauchsfertigen Kontroll-/ Standardseren (100 µl)



INKUBATION 60 Min./ 37 °C
feuchte Kammer



WASCHEN (4 x 300 µl [DIL] [WASH])²



Zugabe der Konjugatlösung [APC] (100 µl)



INKUBATION 30 Min./ 37 °C
feuchte Kammer



WASCHEN (4 x 300 µl [DIL] [WASH])²



Zugabe der Substratlösung [pNPP] (100 µl)



INKUBATION 30 Min./ 37 °C
feuchte Kammer



Zugabe der Stopplösung [STOP] (100 µl)



EXTINKTIONSMESSUNG bei 405 nm

¹Sonderverdünnungspuffer bei folgenden SERION ELISA *classic*:
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Parvovirus B19 IgM sowie Hantavirus Puumala IgG, IgM.

²Bei manueller Abarbeitung:
Platte nach dem Waschvorgang auf Papiertüchern gründlich ausklopfen.

7.5 Manuelle Testdurchführung

1. Erforderliche Anzahl **Kavitäten in den Testrahmen einsetzen** und Protokollblatt anlegen.
2. Je **100 µl der verdünnten Proben bzw. der gebrauchsfertigen Kontrollen** in die benötigten Kavitäten der Teststreifen pipettieren. Eine Kavität für den Substratleerwert freilassen, z. B.:

IgG quantitativ Antigen-Kavitäten	
Kavität A1	Substratleerwert
Kavität B1	Negative Kontrolle
Kavität C1	Standardserum
Kavität D1	Standardserum
Kavität E1	Patient 1....

3. **Probeninkubation** für 60 Minuten (+/- 5 Min) bei 37 °C (+/- 1 °C) in der feuchten Kammer.
4. Am Ende der Inkubationszeit die Kavitäten **waschen** (mit Waschgerät oder manuell):
 - Inkubationsflüssigkeit aus den Kavitäten absaugen oder ausschütten
 - in jede Kavität 300 µl Waschlösung füllen
 - Waschlösung absaugen oder ausschütten
 - Vorgang 3 x wiederholen (also insgesamt 4 x waschen)
 - die Platte auf Papiertüchern ausklopfen
5. **Konjugatzugabe**
100 µl des gebrauchsfertigen IgG Konjugates in die entsprechenden Kavitäten pipettieren (ohne Substratleerwert).
6. **Konjugatinkubation** für 30 Minuten (+/- 1 Min)* bei 37 °C (+/- 1 °C) in der feuchten Kammer.
7. Am Ende der Inkubationszeit die Kavitäten **waschen** (wie oben).
8. **Substratzugabe**
Je 100 µl gebrauchsfertige Substratlösung in alle Kavitäten (auch Substratleerwert) pipettieren.
9. **Substratinkubation** für 30 Minuten (+/- 1 Min)* bei 37 °C (+/- 1 °C) in der feuchten Kammer.
10. **Stoppen der Reaktion**
Je 100 µl Stopplösung in alle Kavitäten pipettieren, Mikrotiterplatte zum Mischen leicht schütteln.
11. **Extinktionsmessung**
Innerhalb 60 Minuten bei 405 nm gegen den Substratleerwert messen, Referenzwellenlänge im Bereich zwischen 620 nm und 690 nm (z. B. 650 nm).

* Bitte beachten Sie, dass unter speziellen Arbeitsbedingungen laborinterne Anpassungen der Inkubationszeiten notwendig sein können.

7.6 Automatische Testdurchführung

Die SERION ELISA sind validiert für die Anwendung auf Immunomat™ sowie auf DYNEX DSX® und DS2® und geeignet für die Anwendung auf baugleichen Automaten. Die automatische Prozessierung erfolgt analog zur manuellen Bearbeitung. Bitte beachten Sie, dass unter speziellen Arbeitsbedingungen laborinterne Anpassungen der Substratinkubationszeiten notwendig sein können.

7.7 Positivkontrolle / Richtigkeitskontrolle

Zur periodischen Überprüfung der Untersuchungsmethode im Rahmen des laborinternen Qualitätsmanagements empfehlen wir die Anwendung unserer SERION ELISA *control*. Die Positivkontrollen dienen als Richtigkeitskontrollen sowie zur Überprüfung der Präzision der angewandten Methode. Der Gebrauch ist in einer separaten Arbeitsanleitung beschrieben.

8 TESTAUSWERTUNG

SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG

8.1 Ein-Punkt-Quantifizierung nach der 4PL-Methode

Die größtmögliche Genauigkeit der Zuordnung von Messsignalen zu quantitativen Werten bieten nichtlineare Funktionen, die sigmoidale Kurven direkt, ohne jede weitere Transformation, der OD-Skala anpassen. Die Konzentrationsbestimmung der Antikörper im SERION ELISA *classic* erfolgt nach dem "4-Parameter logistic-log-Modell" (4PL), dessen mathematische Funktion durch folgende Formel beschrieben wird:

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{Konz.})}}$$

Die Parameter A, B, C und D geben den Kurvenverlauf exakt wieder und definieren

- | | |
|---|---------------|
| 1. die untere Asymptote | ⇒ Parameter A |
| 2. die Steigung der Kurve im Wendepunkt | ⇒ Parameter B |
| 3. den Wendepunkt der Kurve | ⇒ Parameter C |
| 4. die obere Asymptote | ⇒ Parameter D |

Die Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg) ermittelt für jede Kitcharge die Standardkurven in mehrfachen Testläufen unter Einhaltung optimaler Bedingungen. Auf diese Weise entfällt die kosten- und zeitintensive Konstruktion der Standardkurve durch den Anwender.

Zur Auswertung der Testläufe wird jedem SERION ELISA *classic* ein chargenspezifisches Qualitätskontrollzertifikat mit Standardkurve und Wertetabelle beigelegt. Die Software SERION *evaluate* sowie die Excel-basierte Auswertehilfe SERION *activity* werden auf Anfrage gerne zur Verfügung gestellt.

Zum Ausgleich von Testschwankungen und um die Qualität des Testlaufes zu überprüfen, wird das so genannte Standardserum mitgeführt. Diesem Standardserum werden in der Qualitätsendkontrolle ein Sollwert sowie ein Gültigkeitsbereich zugeordnet, innerhalb dessen Grenzen eine sichere und zuverlässige Bewertung der Testergebnisse garantiert wird.

8.2 Testgültigkeitskriterien

- Der Substratleerwert sollte einen OD-Wert < 0,25 aufweisen.
- Die negative Kontrolle muss in der Testauswertung als negativ bewertet werden.
- Bei quantitativen SERION ELISA *classic* muss der OD-Mittelwert des Standardserums nach Abzug des Substratleerwertes innerhalb des Gültigkeitsbereiches liegen, welcher auf dem chargenspezifischen Qualitätskontrollzertifikat angegeben ist.
- Die OD-Werte des Standardserums dürfen nicht mehr als 20 % differieren.

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

8.3 Auswertung SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG

Die Angabe der IgG Antikörperaktivität in IU/ml bezieht sich auf den ersten Internationalen Standard, Statens Serum Institut Kopenhagen, Dänemark. Die Präparation des Standardserums ist mit einer Aktivität von 10 IU/ml deklariert.

Für den Empfindlichkeitsbereich (0,05 bis 2,0 IU/ml Antitoxin) liegt eine Standardkurve sowie eine Wertetabelle bei, mit deren Hilfe jedem im Testansatz erhaltenen OD-Wert die entsprechende Antikörperaktivität zugeordnet werden kann.

8.3.1 Nichtautomatisierte Auswertung

Zur Auswertung der Testläufe wird jedem SERION ELISA *classic* ein chargenspezifisches Qualitätskontrollzertifikat mit Standardkurve und Wertetabelle beigelegt. Der Substratleerwert (blank) muss vor den Auswertungen von allen Messergebnissen abgezogen werden.

Stufenlose Bestimmung der Antikörperaktivitäten mittels Standardkurve:

Testschwankungen, die von Tag zu Tag sowie von Labor zu Labor auftreten können, so genannte Interassay-Varianzen, werden durch Multiplikation des aktuellen Messwerts der Patientenproben mit dem Korrekturfaktor F ausgeglichen:

$$F = \frac{\text{OD-Sollwert (des Standardserums)}}{\text{OD-Tageswert (des Standardserums)}}$$

Dieses Verfahren ist notwendig, um das aktuelle Testniveau des Anwenders an die chargenspezifische Standardkurve anzugleichen bzw. zu normalisieren. Auf diese Weise werden Tagesschwankungen korrigiert.

1. Mittelwert aus den beiden Extinktionswerten des Standardserums bilden und prüfen, ob der ermittelte Wert im angegebenen Gültigkeitsbereich liegt.
2. Berechnung des Faktors F: Der angegebene Sollwert des Standards wird durch den Mittelwert der Extinktion des Standardserums geteilt:

$$F = \text{Sollwert Extinktion Standardserum} / \text{Mittelwert Extinktion Standardserum}.$$
3. Alle Messwerte der Patientenproben werden mit F multipliziert.
4. Über die korrigierten Messwerte können anhand der Standardkurve Antikörperaktivitäten in IU/ml bzw. U/ml abgelesen werden.

Im Falle eines grenzwertigen Ergebnisses sollte der Test parallel mit einer im Abstand von ein bis zwei Wochen entnommenen, neuen Probe (Serumpaar) wiederholt werden.

8.3.2 Automatische Testauswertung mit der Software **SERION evaluate**

Durch Eingabe der vier Parameter und des Sollwertes des Standardserums werden Antikörperaktivitäten nach Prozessierung und Messung des SERION ELISA *classic* durch das Auswerteprogramm SERION *evaluate* errechnet.

Falls ein Wert außerhalb des Gültigkeitsbereiches liegt, werden folgende Fehlermeldungen in englischer Sprache angezeigt:

„Standard values out of ranges in following groups: Group 1-24.“ bzw.
 „Standard value differ more than 20 % in following groups: Group 1-24.“

In diesen Fällen ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

Die vier Kurvenparameter und der Sollwert müssen nur bei Chargenwechsel geändert werden (Parameter und Sollwert sind auf der Wertetabelle angegeben). Die korrekte Eingabe dieser chargenspezifischen Daten kann anhand der dem Standardserum zugeordneten Aktivität (in IU/ml bzw. U/ml) überprüft werden. Der erhaltene Mittelwert der Antikörperaktivität muss mit der auf dem chargenspezifischen Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bewertung übereinstimmen. Eine Messwertkorrektur erfolgt automatisch. Im Ausdruck der Messergebnisse erscheint:

Probenbezeichnung OD-Wert IU/ml bzw. U/ml Bewertung
--

Hinweis: Bei automatischer Testauswertung mit Hilfe der Software SERION *evaluate* ist ein Empfindlichkeitsbereich von 0,05 bis 20 IU/ml prinzipiell auswertbar. Die Konzentrationsbestimmung über 2,0 IU/ml liegt jedoch außerhalb der Quantifizierungsgrenzen des SERION ELISA *classic*.

8.4 Quantifizierungsgrenzen

Die Quantifizierungsgrenzen sind auf dem Kontrollzertifikat des SERION ELISA *classic* angegeben. Im Rahmen der Leistungsbewertungsstudie wurde die Verdünnungslinearität über diesen Bereich nachgewiesen. Sollten Patientenproben Messwerte oberhalb dieses Bereichs erzielen, können die Proben in einer höheren Verdünnung analysiert werden. Die erhaltenen Antikörperkonzentrationen sind dann mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

8.5 Interpretation der Ergebnisse

Eine Bewertung des Antitoxingehaltes wird entsprechend der Weltgesundheitsorganisation (WHO) nach folgenden Kriterien empfohlen:

< 0,01	IU/ml	kein Schutz
0,01 - < 0,1	IU/ml	minimaler Schutz
0,1 - < 1,0	IU/ml	sicherer Schutz
≥ 1,0	IU/ml	Langzeitschutz

Bitte beachten Sie in diesem Zusammenhang, dass die Einteilung der Internationalen Units für den Nachweis von Antikörpern gegen das Diphtherietoxin im Neutralisationstest erfolgte.

Der Empfindlichkeitsbereich der Standardkurve des quantitativen SERION ELISA *classic* für Diphtherie liegt zwischen 0,05 und 2,0 IU/ml.

In der Literatur wird folgendes Vorgehen empfohlen:

Diphtherie-Grundimmunisierung bzw. -Auffrischung in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration (IU/ml)	
< 0,1	Grundimmunisierung, anschließend Kontrolle
0,1-1,0	Impfschutz vorhanden, aber Auffrischung empfohlen
1,0-1,4	Auffrischung nach 5 Jahren
1,5-1,9	Auffrischung nach 7 Jahren
≥ 2,0	Auffrischung nach 10 Jahren

8.6 Referenzbereiche gesunder Probanden

Die Untersuchung von Seren unselektierter Blutspender aus dem süddeutschen Raum mit den SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG ergab folgende Verteilung: Von 88 untersuchten Blutspenderseren zeigten 44 Seren einen Antikörpergehalt gegen Diphtherie-Toxoid von über 0,1 IU/ml. Das heißt, nur bei 50 % der untersuchten Blutspenderseren konnte ein Impfschutz gegen Diphtherie nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Literaturangaben, denen zufolge in Deutschland bei 55 % der Seren eines zufällig zusammengestellten Erwachsenenkollektivs ein Antikörpertiter von über 0,1 IU/ml gefunden wurde. Weitere Autoren kamen zu einem noch geringeren Anteil an geschützten Personen unter der erwachsenen Bevölkerung.

9 LEISTUNGSMERKMALE

9.1 Sensitivität und Spezifität

Bei der Bestimmung eines Immunschutzes gegen Diphtherie werden die Ergebnisse in IU/ml ausgedrückt, die eine Aussage über die Dauer des Immunschutzes erlauben.

Sensitivität, Spezifität und prädiktive Werte können nicht kalkuliert werden, da der Test nicht der Unterscheidung von positiven und negativen Ergebnissen dient, sondern eine kontinuierliche quantitative Bestimmung von Antikörperaktivitäten erlaubt. Diese Art von Testbewertung ist für alle ELISA-Systeme zur Impfschutzkontrolle üblich.

Der SERION ELISA *classic* Diphtherie IgG wurde unter der Verwendung von kommerziell erhältlichen Referenzseren validiert (Quelle: Serolife, Frauenfeld/Schweiz). Die Serumproben (n = 14) wurden u.a. mit dem indirekten Hämagglutinationstest (IHA) sowie mit einer Gewebekulturmethode (Tissue Culture (TC)) untersucht. Die Aktivität wurde in IU/ml angegeben.

Für die Validierung des SERION ELISA *classic* wurden die Reaktionen der Referenzseren in IHA und TC als „Goldstandard“ zugrunde gelegt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse im Detail dargestellt:

Immunitätslage der Einzelprobanden

Serum	IHA	TC	SERION ELISA <i>classic</i>
1	+	+	+
2	-	-	-
3	-	-	-
4	+	+	+
5	-	+	+
6	-	-	-
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	-	+
11	-	-	+
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-

- < 0,1 IU/ml keine oder keine sichere Immunität
- + > 0,1 IU/ml sicherer individueller Immunschutz

SERION ELISA *classic* Diphtherie stimmte mit den beiden Referenzmethoden (Indirekter Hämagglutinationsassay (IHA), biologischer in vitro-Assay (Gewebekultur mit VERO-Zellen (TC)) zu 85,7% überein (Korrelationskoeffizient: 0,964).

9.2 Präzision

Die intraserielle Präzision wurde mit unterschiedlich reaktiven Seren im Mehrfachansatz (n = 20) innerhalb einer antigenbeschichteten Platte ermittelt. Für die Bestimmung der interseriellen Präzision wurden Serumproben mit unterschiedlicher Reaktivität in 10 unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen geprüft.

$$\text{Variationskoeffizient (VK \%)} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100$$

SERION ELISA classic Diphtherie IgG

Probe	Mittlere Extinktion (OD)	Intraassay (VK %)	Mittlere Extinktion (OD)	Interassay (VK %)
negativ	0,036	16,6	0,046	9,6
schwach positiv	0,690	3,9	0,816	4,8
positiv	1,048	4,0	1,344	7,4

10 SICHERHEITSMASSNAHMEN

10.1 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der SERION ELISA *classic* ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

Für die Handhabung der Testreagenzien und der Patientenproben gelten die anerkannten Laborregeln:

- Die Testpackung enthält Verdünnungen humaner Seren. Obwohl alle eingesetzten Seren negativ auf anti-HIV-Ak, HBs-Ag (*Hepatitis B-Virus-surface Antigen*) und anti-HCV-Ak getestet wurden, müssen sie als potentiell infektiös betrachtet werden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In Bereichen, in denen mit Testreagenzien oder mit Patientenproben gearbeitet wird, nicht essen, trinken oder rauchen.
- Beim Umgang mit Testreagenzien und Patientenproben direkten Kontakt durch das Tragen von Laborkittel, Einweghandschuhen und Schutzbrille vermeiden. Hände anschließend gründlich reinigen.
- Die Patientenproben und alle potentiell infektiösen Materialien sind nach der Testdurchführung zu dekontaminieren.
- Die Reagenzien sind unzugänglich für Kinder aufzubewahren.
- Stopplösung:



Ätzend (C); R34: verursacht Verätzungen,

Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel sind zu tragen.

10.2 Entsorgung

Bitte beachten Sie die jeweils geltenden gesetzlichen Vorschriften!

11 LITERATUR

- [1] Naumann, P. et al. (1983) Diphtherie–Immunität und ihre epidemiologische Bedeutung. *Dtsch. med. Wschr.* 108, 1090.
- [2] Pietsch, M. et al. (1993) Immunitätslücken gegen Diphtherie und Tetanus bei Kindern und Jugendlichen. *Sozialpädiatrie* 15, 410.
- [3] Pietsch, M. (1993) Impfserologie zur Ergänzung von Impfungen. *Allgemeinarzt* 18, 1155.
- [4] Porikis, P., Hof, H. (1998) Wie steht es um den Diphtherie-Schutz. *Krankenhaus Arzt* 71, 10-3.
- [5] Rieger, J., Kuhlmann, W. (1994) Diphtherieimmunität der Bevölkerung in Deutschland. *Gesundh.-Wes.* 56, 667-71.
- [6] Robert-Koch-Institut (1999) Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Populationsimmunität gegen Diphtherie und Pertussis. *Epidemiologisches Bulletin* 1.
- [7] Robert-Koch-Institut (1999) Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Zur Diphtherie in Europa. *Epidemiologisches Bulletin* 4.
- [8] Robert-Koch-Institut (1999) Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten; Teil 5: Impfpräventable Krankheiten. *Epidemiologisches Bulletin* 19.
- [9] Robert-Koch-Institut (2009) Aktuelle Aspekte zur Diphtherie in Europa. *Epidemiologisches Bulletin* 2.
- [10] Thilo, W. et al. (1987) Serologische Immunität gegen Diphtherie 1986. *Z. klin. Med.* 42, 1807.
- [11] Wagner, G. und Schumann, H. (1991) Die Diphtherie – eine fast vergessene und doch aktuelle Krankheit. *Wehrmed. Mschr.* 35, 199.