



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](mailto:dialog@virion-serion.de)  
Internet/Интернет: [www.virion-serion.de](http://www.virion-serion.de)

YOUR  
GLOBAL  
PARTNER  
IN  
DIAGNOSTICS



virion\serion

SERION ELISA classic Tetanus IgG

## SERION ELISA *classic* Tetanus IgG



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

(Version/Versione/версия 14.10/01-1)

# Aktualisierungen

Bitte beachten Sie die Änderungen im Vergleich zur Vorversion.

**Versionsnummer:** V 14.10/01-1

**Vorhergehende Version:** V 13.04/12-1

**Änderung in Kapitel:** generelle Überarbeitung +7.2.1

## SERION ELISA *classic* Tetanus 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* Tetanus 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



vorliegende Version: V 14.10/01-1  
Vorversion: V 13.04/12-1

DE

EN

FR

IT

RU

# SERION ELISA *classic* Tetanus IgG

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

SERION ELISA *classic* Tetanus IgG

Best.-Nr.: ESR108G

### 1 ANWENDUNGSBEREICH

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

### 2 DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

*Clostridium tetani*, der Erreger des Tetanus, ist ein ubiquitär vorkommendes, obligat anaerobes Bakterium. Es lebt im Darm von vielen Tieren und z. T. auch des Menschen ohne Krankheitswert zu haben oder eine Immunität zu induzieren.

Die extrem resistenten Sporen gelangen über Fäkalien in den Erdboden bzw. Staub, wo sie jahrelang überleben können. Der Krankheitserreger dringt über verunreinigte Wunden in den Organismus ein. Unter anaeroben Lebensbedingungen entwickeln sich die Sporen zu gram-positiven Stäbchen, die Tetanospasmin, ein hochpotentes Neurotoxin, produzieren, das über eine Steigerung der neuromuskulären Erregung schwerste Muskelkrämpfe verursacht.

Nach einer Inkubationszeit von wenigen Tagen bis mehreren Wochen manifestiert sich die Erkrankung zunächst mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Schwindel, Muskelschmerzen usw. Danach tritt das Vollbild mit Krämpfen craniocaudaler Ausbreitung, die auch die Atemmuskulatur betreffen können, auf. Diese äußerst schmerzhaften Krämpfe werden bei vollem Bewusstsein erlebt und können durch schwache äußere Reize ausgelöst werden. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu Nieren-, Herz- und Kreislaufversagen und Verbrauchskoagulopathie. Trotz intensivmedizinischer Betreuung verstirbt über ein Drittel der Patienten.

Die wichtigste prophylaktische Maßnahme gegen Tetanus ist die aktive Immunisierung mit Tetanustoxoid, die einen sicheren Schutz gegen die Erkrankung gewährleistet. Impfnebenwirkungen treten insbesondere bei häufig durchgeführten Impfungen (erneute Grundimmunisierung bzw. Auffrischimpfungen) auf. Es handelt sich um lokale und systemische allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock.

Zur Überprüfung der Immunitätslage wird die serologische Bestimmung von Antitoxin-IgG Antikörpern mittels der ELISA-Technik durchgeführt. Indiziert ist sie besonders, wenn fragliche Immunität vorliegt, vorangegangene Impfungen nicht mehr erinnerlich sind bzw. lückenhaft dokumentiert wurden, Impfkomplicationen aufgetreten sind oder es sich um

Patienten mit Abwehrschwäche handelt. Durch die serologische Bestimmung der Tetanusimmunität wird der aktuelle Antitoxin-Antikörpergehalt präzise und in Internationalen Units quantifizierbar ermittelt, so dass sich praktische Impfeempfehlungen direkt ableiten lassen.

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

## 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<br>(mit Antigen<br>beschichtet) | ungeöffnet<br><br>nach Anbruch bei 2 – 8 °C in Gegenwart von<br>Trockenmittel und wieder verschlossen gelagert<br><br><i>Die unbenutzten Kavitäten sollen trocken und<br/>luftdicht im verschlossenen Aluminiumbeutel<br/>gelagert werden.</i>                                       | bis Verfallsdatum;<br><br>Mindesthaltbarkeit:<br>4 Wochen;<br><br>Haltbarkeit bei<br>sachgerechter<br>Lagerung: bis zum<br>Verfallsdatum |
| Kontrollseren /<br>Standardseren                   | nach Anbruch bei 2 – 8 °C  | bis Verfallsdatum;<br><br>24 Monate ab<br>Herstellungsdatum  |
| Konjugat   | Gebrauchsfertige Lösung bei 2 – 8 °C<br><br><i>Kontaminationen sind u. a. durch den Gebrauch<br/>steriler Pipettenspitzen unbedingt zu vermeiden.</i>  | bis Verfallsdatum;<br><br>28 Monate ab<br>Herstellungsdatum  |
| Verdünnungspuffer                                  | ungeöffnet<br><br>nach Anbruch bei 2 – 8 °C<br><br><i>Eingetrübte Lösungen bitte verwerfen.</i>  | bis Verfallsdatum;<br><br>36 Monate ab<br>Herstellungsdatum<br><br>24 Monate   |
| Waschlösung  | Konzentrat nach Anbruch bei 2 – 8 °C<br>Gebrauchsverdünnung bei 2 – 8 °C<br>Gebrauchsverdünnung bei Raumtemperatur<br><br><i>Behälter für Gebrauchsverdünnung regelmäßig<br/>reinigen! Eingetrübte Lösungen bitte verwerfen.</i>   | bis Verfallsdatum;<br><br>2 Wochen;<br><br>1 Woche   |
| Substrat   | gebrauchsfertige Lösung bei 2 – 8 °C,<br>lichtgeschützt gelagert<br><br><i>Kontaminationen sind u. a. durch den Gebrauch<br/>steriler Pipettenspitzen unbedingt zu vermeiden.<br/><br/>Bei stärkerer Gelbfärbung (Extinktion gegen<br/>Aqua dest. &gt; 0,25 OD) bitte verwerfen.</i> | bis Verfallsdatum;<br><br>36 Monate ab<br>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 $\mu\text{l}$      | Patientenprobe    |
|                       | zu je 1000 $\mu\text{l}$ | 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 $\mu\text{l}$      | Patientenprobe                |
|                        | zu je 1000 $\mu\text{l}$ | Verdünnungspuffer (= 1 + 100) |
|                        | 20 $\mu\text{l}$         | aus der ersten Verdünnung     |
|                        | zu je 180 $\mu\text{l}$  | 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  $\leq -20$  °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* Tetanus IgG quantitativ

Probenverdünnung<sup>1</sup>  
(Patientenproben)  
1 + 100 bzw. 1 + 1000

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] )<sup>2</sup>



Zugabe der Konjugatlösung [APC] (100 µl)



INKUBATION 30 Min./ 37 °C  
feuchte Kammer



WASCHEN (4 x 300 µl [DIL] [WASH] )<sup>2</sup>



Zugabe der Substratlösung [pNPP] (100 µl)



INKUBATION 30 Min./ 37 °C  
feuchte Kammer



Zugabe der Stopplösung [STOP] (100 µl)



EXTINKTIONSMESSUNG bei 405 nm

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

<sup>2</sup>Bei 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<br>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* Tetanus 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* Tetanus IgG

Die Angabe der IgG Antikörperaktivität in IU/ml bezieht sich auf den ersten Internationalen Standard für Tetanus Immunglobulin, Human (Code: TE-3). Die Präparation des Standardserums ist mit einer Aktivität von 120 IU/Ampulle deklariert.

Für den Empfindlichkeitsbereich von 0,05 bis 5,0 IU/ml Antitoxin bei einer 1 + 100 Gebrauchsverdünnung liegt eine Standardkurve sowie eine Wertetabelle bei, mit deren Hilfe jedem im Testansatz erhaltenen OD-Wert die entsprechende Antikörperaktivität - nach den verschiedenen Methoden - zugeordnet werden kann.

Falls die Seren in der 1+1000 Verdünnung getestet wurden, muss der erhaltene IU/ml-Wert mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

### 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.

### 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 values 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<br>OD-Wert<br>IU/ml bzw. U/ml<br>Bewertung |
|--|

## 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

Folgende Tabelle enthält die Empfehlungen zur Beurteilung des Impftiters u.a. nach Prof. Dr. med. W.D. Kuhlmann, Ernst-Rodenwald-Institut, Koblenz:

| Messwert:        | Beurteilung des Impftiters  |
|------------------|---|
| <0,01 IU/ml      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- kein Impfschutz</li> <li>- je nach Impfanamnese Auffrischimpfung oder ggf. Grundimmunisierung durchführen</li> </ul>   |
| 0,01 - 0,1 IU/ml | <ul style="list-style-type: none"> <li>- kein sicherer protektiver Impfschutz</li> <li>- Auffrischimpfung empfohlen;</li> <li>- serologische Kontrolle nach 4 - 6 Wochen</li> </ul>   |
| 0,11 - 0,5 IU/ml | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ausreichender Impfschutz</li> <li>- Kontrolle des Antitoxinspiegels in ca. 2 Jahren empfohlen</li> <li>- Auffrischimpfung führt zu langfristigem Impfschutz</li> </ul>   |
| 0,51 - 1,0 IU/ml | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ausreichender Impfschutz</li> <li>- Kontrolle des Antitoxin-Titers in ca. 2 Jahren empfohlen</li> <li>- Auffrischimpfung nicht erforderlich.</li> <li>- Hinweis: Impfung bei Vorliegen von Antitoxin-Titern größer als 0,5 IU/ml kann zu Nebenwirkungen führen.</li> </ul> |
| 1,01 - 5,0 IU/ml | <ul style="list-style-type: none"> <li>- langfristig schützender Bereich</li> <li>- Titerkontrolle in 5 - 10 Jahren</li> </ul>  |
| > 5,0 IU/ml      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- langfristig schützender Bereich</li> <li>- Titerkontrolle nach ca. 10 Jahren</li> </ul>  |

Bitte beachten Sie in diesem Zusammenhang, dass sich die Angaben der internationalen Units in der Tabelle für den Nachweis von Antikörpern gegen das Tetanustoxin im *in vivo* Mäusetest erfolgte.

Eine Interpretation, die sich unter Verwendung der ELISA-Technik auf Abstufungen unter 0,1 IU/ml bezieht, liegt unterhalb der technisch reproduzierbaren Sensitivitätsgrenze.

Die ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut von Juli 2001 veröffentlichte folgende Impfeempfehlung: „Alle Personen bei fehlender oder unvollständiger Grundimmunisierung, wenn die letzte Impfung der Grundimmunisierung oder die letzte Auffrischimpfung länger als 10 Jahre zurückliegen.“

Weitere Vorgehensweisen, wie z. B. die Tetanus-Immunprophylaxe im Verletzungsfall, entnehmen Sie bitte der aktuellen Impfeempfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut.

## **8.6 Referenzbereiche gesunder Probanden**

Die Untersuchung von Seren unselektierter Blutspender aus dem süddeutschen Raum mit den SERION ELISA *classic* Tetanus IgG ergab folgende Verteilung: Von 88 untersuchten Blutspenderseren zeigten 82 Seren einen Antikörpergehalt gegen Tetanustoxoid von über 0,1 IU/ml. Das heißt, bei 93,2 % der untersuchten Blutspenderseren konnte ein Impfschutz gegen Tetanus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Literaturangaben, denen zufolge in Deutschland bei 96 % der untersuchten Männer und bei 71 % der untersuchten Frauen ein Antikörpertiter von über 0,1 IU/ml gefunden wurde. Hierbei wurden auch ältere Personen zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr einbezogen, die offenbar über einen stark zurückgehenden Impfschutz aufweisen und die in dem von uns untersuchten Panel der Blutspenderseren nicht mehr entsprechend vertreten waren. Die eigenen Ergebnisse von 93,2 % korrelieren daher gut mit den Literaturangaben.

## **9 LEISTUNGSMERKMALE**

### **9.1 Sensitivität und Spezifität**

Bei der Bestimmung eines Immunschutzes gegen Tetanus werden die Ergebnisse in IU/ml ausgedrückt, deren Höhe eine Aussage über die Dauer des Immunschutzes erlaubt.

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.

Eine externe Testevaluierung des SERION ELISA *classic* Tetanus IgG wurde am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz, Laborabteilung Medizin-Immunologie (Prof. Dr. med. Kuhlmann) durchgeführt. Als Vergleichstest wurde ein hausinterner ELISA Test des obengenannten Instituts herangezogen.

Die Austestung von 269 Seren im SERION ELISA *classic* und dem Vergleichstest zeigte eine gute Übereinstimmung der Messergebnisse beider Tests über den gesamten Messbereich. Eine Korrelation von  $r=0,94$  wurde im Wertebereich von 0,1 bis 10 IU/ml gefunden.

## 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, an 5 verschiedenen Tagen durchgeführten Ansätzen geprüft.

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

### **SERION ELISA classic Tetanus IgG**

| <b>Probe</b>  | <b>Mittlere Extinktion (OD)</b> | <b>Intraassay (VK %)</b> | <b>Mittlere Extinktion (OD)</b> | <b>Interassay (VK %)</b> |
|---------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| schwach pos.  | 0,089                           | 5,8                      | 0,102                           | 8,9                      |
| positiv       | 0,952                           | 2,8                      | 1,059                           | 2,8                      |
| stark positiv | 2,629                           | 1,6                      | 2,767                           | 3,6                      |

## 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] Kuhlmann W. D. (1991) Tetanus. Impfung, Impftiter und Impfreaktion. Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz.
- [2] Müller H.E., Müller M., Schick W. (1988) Tetanus-Schutzimpfung-Indikation und Kontraindikation. Dtsch. med. Wschr. 113, 1326-8.
- [3] Pietsch M. (1991) Indikationsbeispiele für die Tetanus-Antikörper-Bestimmung. Fortschritte der Diagnostik 1, 30-1.
- [4] Pietsch M., Geißler E., Pietsch R., Borneff J. Tetanuserkrankung-Klinik und Impfprophylaxe. Ärzteblatt Rheinland-Pfalz 41, 579-87.
- [5] Pietsch M., Pietsch R. (1989) Einsatz der ELISA-Technik zur Messung antitoxischer Tetanus-Antikörper. Wehrmed. Mschr. 6, 258-62.
- [6] Robert-Koch-Institut (2001) Impfempfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 28.
- [7] Schröder J.P., Kuhlmann W.D. (1991) Tetanusimmunität bei Männern und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland. Immun. Infekt. 19, 14-7.
- [8] Schröder J. P., Kuhlmann W. D. (1992) Tetanusimpfschutz und Vermeidung von Nebenreaktionen bei Auffrischimpfungen. Dtsch. med. Wschr. 117, 1903-6.
- [9] Staak M., Wirth E. (1973) Zur Problematik anaphylaktischer Reaktionen nach aktiver Tetanusimmunisierung. Dtsch. med. Wschr. 98, 110-1.