

Kit ELISA IgG anti-difterite

N° articolo: EC129.00

Codice colore: bianco

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

**Sekisui Virotech GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

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



Druckdatum 17.11.2015

REV 18 / Diphtherie ELISA IgG IT

Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test	3
3. Contenuto della confezione (kit per test IgG)	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso.....	3
5. Precauzioni e avvertenze	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito).....	4
7. Esecuzione del test.....	4
7.1 Materiale di analisi	4
7.2 Preparazione dei reattivi	4
7.3 Esecuzione del test Virotech ELISA	4
7.4 Impiego di strumenti ELISA.....	5
8. Valutazione del test.....	5
8.1 Controlli funzionali del test	5
8.2 Valutazione.....	5
8.3 Interpretazione.....	6
8.4 Limiti del test.....	6
9. Valutazione del test delle IgG con il metodo dei 4 parametri.....	7
9.1 Controlli funzionali del test	7
9.2 Nuovo calcolo dei risultati quantitativi in Unità Internazionali al millilitro (UI/ml)	7
10. Bibliografia	8
11. Schema di svolgimento del test	9

1. Finalità d'uso

Il test ELISA anti-difterite serve all'individuazione quantitativa di anticorpi IgG contro la tossina difterica per il controllo dell'esito della vaccinazione e la determinazione delle condizioni successive.

2. Principio del test

L'anticorpo ricercato nel siero umano forma un complesso immunitario con l'antigene fissato sulla micropiastra. Le immunoglobuline non legate sono rimosse mediante processi di lavaggio. Il coniugato enzimatico si lega a questo complesso. Il coniugato non legato è rimosso anch'esso a sua volta mediante processi di lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione di substrato (TMB), l'attività enzimatica (perossidasi) causa la comparsa di una colorazione blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante.

3. Contenuto della confezione (kit per test IgG)

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti singoli in strip frazionabili, rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **soluzione PBS per lavaggio (concentrata 20 volte) 50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
4. **sieri standard IgG** per la curva standard, 6 flaconcini da 2 ml, pronti per l'uso, siero umano con conservante; 0,001IU/ml, 0,002IU/ml, 0,005IU/ml, 0,01IU/ml, 0,02IU/ml, 0,05IU/ml (IU = international units, unità internazionali).
5. **controllo IgG altamente positivo, 2 ml**, siero umano con conservante, pronto per l'uso
6. **controllo IgG debolmente positivo, 2 ml**, siero umano con conservante, pronto per l'uso
7. **coniugato IgG (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con stabilizzante proteico e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
8. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 11ml**, pronta per l'uso
9. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Dopo aver staccato i pozzetti individuali occorrenti, conservare le rimanenti strisce di pozzetti in sacchetto chiuso con essiccante a 2-8°C. Subito dopo l'uso, riporre i reattivi in ambiente a 2-8°C.
2. Il coniugato pronto per l'uso e la soluzione per substrato TMB sono sensibili alla luce e devono essere conservati al riparo dalla luce. Se per l'azione della luce si sviluppa nella soluzione per substrato un'alterazione del colore, la soluzione deve essere eliminata.
3. Prelevare soltanto la quantità di coniugato o di TMB necessaria per il test da eseguire. L'eventuale quantità di coniugato o TMB in eccesso non può essere rimessa nel recipiente originale, ma deve essere eliminata.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	diluiti	da +2 a +8°C	max. 6 ore
	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Micropiastra	dopo l'apertura	da +2 a +8° (conservazione nella busta in dotazione con sacchetto di essiccante)	3 mesi
Assorbente di fattore reumatoide	non diluiti, dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	1 settimana
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Tetrametilbenzidina	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione bloccante	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Soluzione per lavaggio	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +25°C	4 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

1. Sono impiegati come sieri standard e di controllo esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per gli anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV e verso l'antigene di superficie dell'epatite B. Tuttavia i campioni, i campioni diluiti, i sieri standard, i controlli, i coniugati e le strisce per microtitolazione devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. I componenti che contengono conservanti, come pure la soluzione bloccante al citrato e il TMB, sono irritanti per la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questi materiali, lavare immediatamente la parte interessata sotto acqua corrente e consultare eventualmente un medico.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Acqua distillata/demineralizzata
2. Pipetta a 8 canali 50µl, 100µl
3. Micropipette: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Provette per i campioni
5. Salviette di carta o carta assorbente
6. Pellicola protettiva per piastre ELISA
7. Contenitore per rifiuti infetti
8. Lavatore a mano ELISA o lavatore automatico per micropiastre
9. Spettrofotometro per micropiastre con filtro 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)
10. Incubatore

7. Esecuzione del test

Seguire scrupolosamente il metodo prescritto da Sekisui Virotech è il requisito indispensabile per ottenere i risultati corretti.

7.1 Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

Preparare le diluizioni per i pazienti sempre fresche.

Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente il siero.

1. Utilizzare solo siero fresco e non inattivato.
2. Non impiegare campioni iperlipemici, emolitici e contaminati da batteri, né sieri torbidi (falsi positivi/negativi).

7.2 Preparazione dei reattivi

La Sekisui Virotech System Diagnostica consente una grande flessibilità grazie alla possibilità offerta di impiegare tamponi di diluizione e lavaggio, TMB, soluzione bloccante di citrato e coniugato che soddisfano una vasta gamma di parametri e lotti. **I sieri standard, nonché il controllo altamente e debolmente positivo, sono destinati esclusivamente al kit utilizzato.** Non impiegare pertanto con altri lotti.

1. Regolare l'incubatore su 37°C e verificare che questa temperatura sia stata raggiunta prima dell'inizio dell'incubazione.
2. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente; aprire la confezione delle strisce di reazione solo una volta raggiunta questa temperatura.
3. Agitare bene tutti i componenti liquidi prima dell'uso.
4. Diluire la soluzione concentrata per lavaggio con acqua distillata/demineralizzata fino a ottenere 1 litro (in caso di formazione di cristalli del concentrato, portarlo a temperatura ambiente prima della diluizione e agitare bene prima dell'uso).

7.3 Esecuzione del test Virotech ELISA

1. Per ogni serie di test, dispensare 100µl del tampone di diluizione pronto per l'uso (bianco), dei sieri di controllo e standard pronti per l'uso e dei sieri diluiti dei pazienti. Raccomandiamo sempre una doppia serie (bianco, sieri standard, controlli e sieri pazienti). Nel caso in cui per la valutazione del test con il metodo dei 4 parametri si utilizzi, come controllo

di calibrazione, lo standard di 0,01 UI/ml, è obbligatoria una doppia serie. Diluizione operativa dei sieri dei pazienti: 1+100; ad es. 10µl di siero + 1ml di tampone di diluizione.

2. La dispensazione è seguita da un'incubazione per 30 min a 37 °C (con pellicola protettiva).
3. Il periodo d'incubazione viene concluso da 4 lavaggi, ciascuno eseguito con 350-400µl di soluzione di lavaggio per ogni pozzetto. Non lasciare la soluzione di lavaggio nei pozzetti. Gli ultimi residui di liquido devono essere eliminati rovesciando e battendo la piastra su un foglio di carta assorbente.
4. Dispensare 100µl del coniugato pronto per l'uso in tutti i pozzetti.
5. Incubazione del coniugato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva).
6. Terminare l'incubazione del coniugato mediante 4 lavaggi (vedere punto 3).
7. Dispensare in ogni pozzetto 100µl della soluzione per substrato TMB pronta per l'uso.
8. Incubazione della soluzione per substrato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva, tenere al buio).
9. Bloccaggio della reazione del substrato: dispensare 50µl della soluzione bloccante di citrato in ciascun pozzetto. Agitare con cautela e accuratamente la piastra fino alla completa miscelazione dei liquidi e alla comparsa di una colorazione gialla uniforme.
10. Misurare le estinzioni (DO) a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm). Regolare il fotometro in modo da poter sottrarre da tutte le altre estinzioni il valore del bianco misurato. La misurazione fotometrica dovrebbe essere effettuata entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

7.4 Impiego di strumenti ELISA

Tutti i test ELISA Sekisui Virotech possono essere elaborati con strumenti ELISA. L'utilizzatore è tenuto ad eseguire regolari convalide dell'apparecchiatura.

I prodotti ELISA della G.V. sono stati validati sui seguenti analizzatori ELISA (quali Immunozone, Plato 1300GSG, Plato 3300 GSG, e Monet TKA). L'utilizzatore dovrà regolarmente verificare la costante affidabilità del sistema con la seguente procedura:

1. In caso di installazione o di importanti riparazioni del processore ELISA, Sekisui Virotech raccomanda di eseguire la convalida dell'apparecchio secondo le indicazioni del costruttore.
2. Si raccomanda di controllare poi il processore ELISA con il kit di convalida (EC250.00). Questo regolare controllo con il kit di convalida dovrebbe essere eseguito almeno una volta ogni tre mesi.
3. Ogni ciclo di test eseguito deve rispondere ai criteri di idoneità del certificato di controllo qualità allegato al prodotto.

Questa procedura garantisce il perfetto funzionamento del processore ELISA e serve inoltre anche alla garanzia di qualità del laboratorio.

8. Valutazione del test

8.1 Controlli funzionali del test

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15.

I valori DO dello standard minimo (0,001 UI/ml) devono essere superiori al valore DO indicato nel certificato di controllo della qualità, mentre i valori DO dello standard massimo (0,050 UI/ml) devono essere inferiori al valore DO indicato nel certificato di controllo della qualità.

b) La concentrazione così definita del controllo debolmente e altamente positivo dovrebbe essere compresa entro i valori limite indicati sul certificato di controllo qualità (IU/ml).

c) Se tali requisiti (DO, UI/ml) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

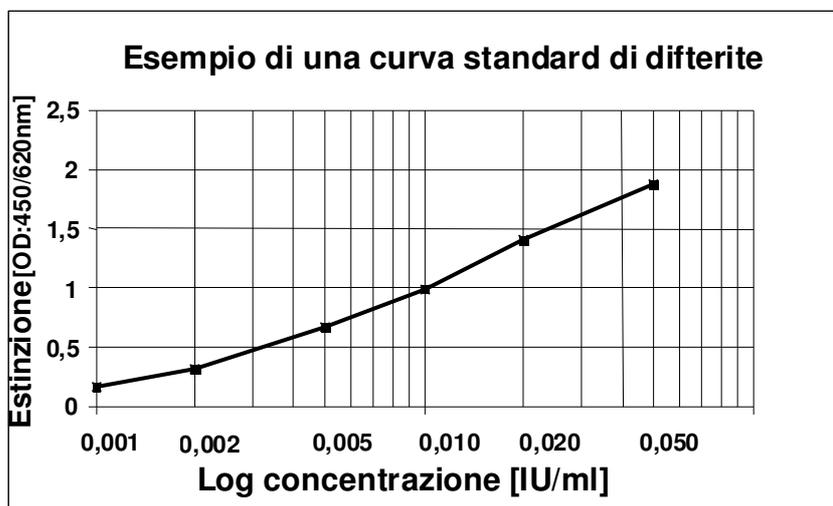
8.2 Valutazione

Per calcolare la concentrazione di anticorpi IgG anti-tossina difterica nel siero, con l'ausilio dei sieri standard utilizzati si disegna una curva standard sull'acclusa carta millimetrata semilogaritmica. A tal fine si riportano i valori medi delle estinzioni dei sieri standard doppi sull'asse delle ordinate (asse y) e le concentrazioni (IU/ml) degli standard pronti per l'uso sull'asse delle ascisse (asse x). Occorre tenere conto che, per l'esecuzione del test, i sieri dei pazienti sono stati diluiti 1:100. Pertanto occorre moltiplicare per 100 il risultato ricavato dal diagramma. Per la creazione della curva standard è possibile selezionare sia un calcolo punto-a-punto, sia un calcolo a 4 parametri.

Si prega di fare attenzione a quanto segue:

È possibile utilizzare in una nuova sessione di analisi, con una diluizione 1:10, campioni le cui concentrazioni in IU/ml definite risultino inferiori a 0,1 IU/ml. Durante la valutazione si deve tenere conto della diluizione discrepante.

I campioni, i cui valori di estinzione sono superiori a quelli dello standard di 0,05IU/ml, vanno impiegati in diluizioni superiori, ad es. 1:200, 1:400 ecc. Nei valori DO superiori a 2,00, la precisione di misurazione si riduce all'aumentare della densità ottica. Si raccomanda pertanto di utilizzare i sieri, che alla diluizione di 1:100 raggiungono valori OD superiori a 2,00, a diluizioni superiori durante il test, ad es. 1:200, 1:400, ecc. Durante l'analisi si dovrà tenere conto delle diluizioni discrepanti.



8.3 Interpretazione

Le concentrazioni di anti-tossina difterica vengono espresse in unità internazionali (IU/ml) sulla scorta degli Standard OMS. Secondo i dati presenti nella corrispondente letteratura, si deve prevedere una sufficiente protezione immunitaria a partire da 0,1IU/ml (2,8,9,11). Tali indicazioni vanno comunque considerate soltanto a titolo di raccomandazione!

Di seguito si riportano alcune raccomandazioni relative alla vaccinazione, ricavate dalla pubblicazione di Pietsch, M. (10).

IU/ml	Vaccinazione raccomandata
< 0,1	immunizzazione di base immediata
0,1 - 1,0	richiamo immediato
1,0 - 1,4	richiamo dopo 5 anni
1,4 - 2,0	richiamo dopo 7 anni
> 2,0	richiamo dopo 10 anni

La determinazione della concentrazione di anticorpi IgG anti-tossina difterica può rappresentare un valido ausilio qualora si intenda determinare la necessità di una vaccinazione, così come se ne può tenere conto anche per il controllo serologico della vaccinazione. E' altresì possibile ricevere informazioni sulla diversa risposta del sistema immunitario individuale.

8.4 Limiti del test

1. L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio eventualmente disponibili.
2. Il test Virotech ELISA anti-difterite non è indicato per la diagnosi di laboratorio di un'infezione.
3. Per l'interpretazione del titolo anti-tossina si raccomanda di tenere conto anche del certificato di vaccinazione e/o dell'indicazione dell'ultima vaccinazione preventiva antidifterica (7).
4. Si sconsiglia l'interpretazione di titoli antitossine inferiori a 0,1 IU/ml, poiché essa si trova al di sotto del limite riproducibile di sensibilità in caso di impiego di un sistema di test ELISA. Si raccomanda pertanto di ricavare

l'anamnesi di vaccinazione per ogni singolo caso, al fine di decidere se si debba eseguire un'immunizzazione di base o una vaccinazione di richiamo.

9. Valutazione del test delle IgG con il metodo dei 4 parametri

Con il test Virotech ELISA per IgG anti-difterite, esiste la possibilità di eseguire una determinazione quantitativa con il metodo dei 4 parametri. Come controllo della calibrazione, in questo caso si applica lo standard di 0,01 UI/ml. Il controllo di calibrazione compensa le oscillazioni dovute all'esecuzione del test. Per il calcolo si utilizzano i valori DO medi.

9.1 Controlli funzionali del test

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15.

Il valore DO del controllo di calibrazione deve rientrare nei limiti indicati nel certificato di controllo qualità.

b) UI/ml

La concentrazione di IgG anti-difterite (UI/ml) del controllo debolmente positivo e del controllo altamente positivo deve essere compresa entro i valori indicati sul certificato di controllo qualità.

Se tali requisiti (valori OD, UI/ml) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

9.2 Nuovo calcolo dei risultati quantitativi in Unità Internazionali al millilitro (UI/ml)

L'estinzione del valore bianco (450/620 nm) deve essere sottratta da tutte le estinzioni.

La quantificazione dei sieri dei pazienti avviene mediante equiparazione alle Unità Internazionali. Tramite test completi, si determina la curva standard mediante regressione non lineare, curva descritta matematicamente dalla seguente formula (12):

$$UI/ml = e^{(C - \ln((D - A) / (DO\ corr - A) - 1) / B)}$$

Dove

- A è il valore DO previsto in caso di concentrazione di IgG anti-difterite pari a 0
- B è il fattore d'incremento
- C è il punto d'inversione
- D è il valore DO previsto in caso di concentrazione di IgG anti-difterite infinitamente alta
- DO corr. è il valore DO corretto del siero del paziente

Al fine di tenere conto delle oscillazioni nell'ambito dell'elaborazione del test, si corregge il valore DO misurato del siero del paziente sulla scorta di un controllo di calibrazione:

$$DO\ corr = DO\ siero\ paziente * \frac{DO\ parametro\ controllo\ calibrazione}{DO\ controllo\ calibrazione\ misurato}$$

Per i valori dei parametri A, B, C e D, nonché gli standard relativi ai valori DO del controllo di calibrazione, consultare il certificato.

In caso di software di valutazione non compatibile con questo metodo di calcolo, nel certificato sono definite altre 6 coppie di valori standard, che ugualmente descrivono la curva standard.

Il range quantificabile è compreso tra 0,03 UI/ml e 10 UI/ml.

Determinazione delle UI/ml

La determinazione delle UI/ml può avvenire mediante un software acquistabile presso Virotech. In alternativa è possibile disporre di una valutazione predefinita per calcoli correnti su tabella.

10. Bibliografia

1. Epidemiologisches Bulletin, 6/2001
2. Stark K, Schonfeld C, Barg J, Molz B, Vornwald A, Bienzle U, Seroprevalence and determinants of diphtheria, tetanus and poliomyelitis antibodies among adults in Berlin, Germany, *Vaccine* 17(7-8): 844-50 (1999)
3. Pietsch M et.al., Influence of information campaigns on the vaccination immunity among the population of a small town area – seroepidemiological results of the „Wittlich Vaccination Study“; *Gesundheitswesen* 64 (1): 60-4 (2002)
4. Epidemiologisches Bulletin, 19/1999
5. Pachon I, Amela C, De Ory F: Age-specific seroprevalence of poliomyelitis, diphtheria and tetanus antibodies in Spain, *Epidemiol Infect* 2002, 129 (3): 535-41
6. *Ärztezeitung*, 23.04.2003; Norddeutsche sind Impfmuffel in Deutschland
7. Gupta RK, Griffin P Jr, Xu J, Rivera R, Thompson C, Siber GR, Diphtheria antitoxin levels in US blood and plasma donors. *J Infect Dis* 1996, 173 (6) 1493-7
8. Naumann, P., Hagedorn, H.-J. Paatz, R. (1983), Diphtherie-Immunität und ihre epidemiologische Bedeutung, *Dtsch. med. Wschr.* 108, S. 1090-1096
9. Naumann, P., Paatz, R, und Thomas, L, Diphtherie-Adsorbat-Impfstoff für Erwachsene: Immunologische Wirksamkeit. *Die gelben Hefte XXIV* (1984), S. 109-115
10. Pietsch, M., *Impfserologie zur Ergänzung von Impfungen. Der Allgemeinarzt*, 18, 1993
11. Galazka, A.M., *Diphtheria: The Immunological Basis for Immunization Series; WHO/EPI/GEN/93,12; Geneva*, pp3
12. Plikaytis et al., Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate Neisseria meningitidis Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 1991, *J Clin Microbiol*, 29, p1439-1446

Preparazione dei campioni dei pazienti e soluzione di lavaggio

▼ **Soluzione di lavaggio:** diluire il concentrato con acqua distillata/demineralizzata fino ad ottenere 1 litro.

▼ **Campioni di IgG – diluizione 1:101**

per es.:

10 µl di siero/plasma + 1000 µl di tampone per diluizione
(il tampone per diluizione del siero è pronto per l'uso)

Esecuzione del test

Preincubazione	30 minuti a 37 °C	100 µl campioni pazienti Bianco (tampone per diluizione) standard e controlli
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione coniugato	30 minuti a 37 °C	100 µl coniugato IgG
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione substrato	30 minuti a 37 °C	100 µl substrato
↓		
Bloccaggio		50 µl soluzione bloccante agitare con cautela
↓		
Misurare estinzione		Fotometro a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)