RIDASCREEN® Tetanus IgG

Enzymimmunoassay zum Nachweis von
IgG-Antikörpern gegen Tetanustoxoid in Serum

Enzyme immunoassay for the detection of
IgG antibodies against tetanus toxoid in serum

Art. No.: K 3721

In vitro Test
Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm GmbH
Dolivostr. 10
D-64293 Darmstadt

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-0
Sekretariat Marketing	(0 61 51) 81 02-23

Telefax:

Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-20
Marketing	(0 61 51) 81 02-40

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm GmbH
Hersteller: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland

RIDA® and RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm GmbH
Manufacturer: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Allgemeines ... 4
2. Einleitung ... 4
3. Testprinzip ... 4
4. Packungsinhalt ... 5
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör ... 6
6. Vorsichtsmaßnahmen ... 6
7. Reagenzien und ihre Lagerung ... 7
8. Anzeichen für Reagenzienverfall ... 7
9. Sammlung und Lagerung der Proben ... 7
10. Testdurchführung ... 8
11. Auswertung ... 11
12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation ... 13

Contents

page

1. Intended use ... 14
2. General ... 14
3. Test principle ... 15
4. Reagents provided ... 16
5. Materials required but not provided ... 16
6. Warnings and precautions for the users ... 17
7. Storage instructions ... 17
8. Indication of instability or deterioration of reagents ... 18
9. Specimen collection and storage ... 18
10. Test procedure ... 18
11. Analysis ... 21
12. Remarks about the test procedure and interpretation ... 23

Appendix

Literature ... 23

1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® Tetanus-Test ist ein Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Tetanustoxoid in humanem Serum.

2. Einleitung

Tetanus (Wundstarrkrampf) wird durch ein Toxin von Clostridium tetani verursacht. Clostridium tetani ist wie die anderen Clostridien ein im Boden ubiquitär vorkommender Keim. Clostridien sind 1 µm dicke und 3 - 8 µm lange, grampositive Stäbchen. Clostridien reagieren empfindlich auf Sauerstoff und sind in der Lage Sporen zu bilden. Viele Clostridien sind apathogene Saprophyten. Einige zeichnen sich aber durch die Fähigkeit zur Bildung von Toxinen aus, wobei auch innerhalb einer Spezies toxigene und atoxigene Stämme vorkommen.
Das Neurotoxin von C. tetani heißt Tetanospasmin. Nach Infektion von offenen Wunden dringt der Erreger in das Gewebe ein. Unter anaeroben Bedingungen kommt es dann zur Vermehrung und Ausscheidung des Toxins. Dieses gelangt entweder über das Blut oder entlang der Axone in das ZNS. Dort wird die natürliche Hemmung der motorischen Neurone blockiert, wodurch ein schmerzhafter Tonus der quergestreiften Muskulatur induziert wird.
Nach einer Inkubationszeit von 4 - 21 Tagen setzen die tonischen Krämpfe meist im Bereich der Kaumuskulatur ein und greifen von dort auf Nacken und Stamm, seltener auf die Extremitäten über. Der Verlauf ist meist akut und endet unbehandelt im Erstickungstod durch Verkrampfung der Atemmuskulatur. Durch moderne Therapie (Antitoxin, Curare, Valium) und aktive Immunisierung konnte die hohe Letalität von früher 90 % auf ca. 50 % gesenkt werden.
Wegen der bereits im Säuglingsalter vorgenommenen Immunisierung mit einem Toxoidimpfstoff liegt heutzutage in entwickelten Ländern die Inzidenz nur noch bei 1/1 Mio. Einwohner. Die Impfung sollte alle 5 - 10 Jahre durchgeführt werden. Bei bestehendem Impfschutz sollten Verletzte jedoch, deren letzte Impfung mehr als fünf Jahre zurückliegt, vorsichtshalber geboostert werden. Ist der Impfstatus unklar, muß humanes Antitoxin verabreicht werden.
Der Impfstatus kann mit einem modernen ELISA, wie dem RIDASCREEN® Tetanus IgG EIA, leicht ermittelt werden. Durch Verwendung eines Toxoidantigens und Anpassung an internationale Einheiten ist die Vergleichbarkeit gemessener Werte gewährleistet.

3. Testprinzip

An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen ist Tetanustoxoid gebunden. In diese Vertiefungen werden verdünnte Patientenproben sowie die Kontrollen pipettiert und bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei binden vorhandene Antikörper an die immobilisierten Antigene. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt.
Danach erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Anti-human-Antikörpers (anti-IgG). Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschliessend erfolgt die Zugabe von Substrat (H_2O_2/TMB), das bei positiven Proben durch gebundenes Enzym zur Entwicklung einer blauen Farbe führt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm).

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.
Jeder Reagenziensatz enthält:

1 x 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) mit je 8 Vertiefungen im Halterahmen;
beschichtet mit Tetanustoxoid;
in verschließbarem Alu-Beutel
1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);
Probenpuffer, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10fach konz.);
Waschpuffer, enthält 0,2 % Bronidox-L
1 x Standardkontrolle IgG (2,5 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
1 x Negativkontrolle (1,2 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
1 x RIDASCREEN® SeroG HD (12 ml);
Anti-*human-IgG*-Konjugat;
Peroxidase-markierter Antikörper (Kaninchen);
gebrauchsfertig
1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);
H_2O_2/Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml)
1 N Schwefelsäure
1 x Gebrauchsanleitung

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

5.2. Zubehör

- feuchte Kammer bei 37 °C
- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl Volumina
- Meßzylinder (1000 ml)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Standardkontrolle und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HBsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Standardkontrolle und Negativkontrolle, sowie der Probenpuffer enthalten als Konservierungsmittel 0,01 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Der Waschpuffer enthält Bronidox-L als Konservierungsmittel. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch der Kontrollseren zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht möglich.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
Der verdünnte Waschpuffer (RIDASCREEN® SeroWP) ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.
Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, daß der Klippverschluß nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.
Eine Kontamination des Substrates (RIDASCREEN® SeroSC) mit der Konjugatlösung ist unbedingt zu vermeiden, da diese eine Verfärbung des Substrates zur Folge hat. Ebenso ist eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten
- ein Extinktionswert der Negativ-Kontrolle bei 450/620 nm > 0,3
- ein Extinktionswert des Standardkontrollserums bei 450/620 nm außerhalb des im beigefügten Auswerteblatt angegebenen Wertebereichs.

9. Sammlung und Lagerung der Proben

Der RIDASCREEN® Tetanus IgG EIA ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.
Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu einer Woche bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich.
Serumverdünnungen sind nicht länger als 7 Stunden bei 2 - 8 °C haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Allgemeines

Einzelne der im vorliegenden Test verwendeten Reagenzien sind nicht kitspezifisch. Diese mit RIDASCREEN® Sero bezeichneten Reagenzien (SeroWP, SeroPP, SeroG HD, SeroSC, SeroStopp) können auch bei anderen RIDASCREEN® EIAs mit entsprechend deklarierten Reagenzien verwendet werden. Dies gilt nicht für die chargenspezifischen Kontrollseren.
Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab. Eine Abweichung von den vorgegebenen Inkubationszeiten und Temperaturen führt zu einer übermäßigen Differenz der Standardkontrolle zum vorgegebenen Sollwert, welche nicht mehr von dem ermittelten Wertebereich abgedeckt wird.
Während des Waschens ist darauf zu achten, daß alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und daß zwischen den Waschschritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschschritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.
Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.
Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Puffer-Konzentrates (RIDASCREEN® SeroWP) wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Hierfür werden 100 ml des Puffer-Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Puffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

10.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer (RIDASCREEN® SeroPP) verdünnt.

Verdünnung der Serumprobe 1:100:

z. B. 10 µl Serum + 990 µl Probenpuffer

Achtung!
Negativkontrolle und Standardkontrolle sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.

10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, die Position A1 (Reagenzienleerwert) bleibt frei. Die Negativkontrolle wird einfach und die Standardkontrolle doppelt mitgeführt. Die Platte wird 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei sollte der Boden der Kavitäten keinen Kontakt zu gut wärmeleitenden Materialien (Metall oder feuchtes Papier) haben.

A1	Reagenzienleerwert
B1	Negativkontrolle
C1	Standardkontrolle
D1	Standardkontrolle
E1, F1	Patientenserum 1, 2, usw.

Achtung!
Die ELISA-Platte darf nicht in ein kühles Inkubationsbehältnis gestellt werden, das sich erst während der Inkubation auf 37 °C erwärmt. Das Behältnis muß schon vorab an 37 °C adaptiert sein.

10.5. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und die Platte anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 4mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten.

10.6. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroG HD (Anti-*human-IgG*-Konjugat) in alle Vertiefungen (einschließlich A1). Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

10.7. Waschen

4maliges Waschen gemäß Pkt. 10.5.

10.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroSC in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp in alle Vertiefun-

gen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen den Reagenzienleerwert (Position A1).

Achtung:
Zur Entfernung von Kondenswasser muß die Unterseite der Mikrotiterplatte vor der Messung abgewischt werden.

Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des RIDASCREEN® SeroWP
3. Herstellung der Serumverdünnungen
4. Pipettieren von 100 µl Standardkontrolle und Negativkontrolle bzw. Probe in die Mikrotiterstreifen; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
6. Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroG HD; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
7. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
8. Zugabe von je 100 µl RIDASCREEN® SeroSC; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
9. Nach Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp photometrische Auswertung bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm)

11. Auswertung

Die Auswertung des Tests kann auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt werden:

1. über die beiliegende Standardkurve
2. über die Wertetabelle (siehe beiliegendes Datenblatt)
3. mathematisch nach der 4-Parameter-Auswertung oder der α-Methode

Von allen Extinktionswerten muß vor der Auswertung der Reagenzienleerwert abgezogen werden.

11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Standardkontrolle (Doppelbestimmung) und Negativkontrolle mit zuführen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle bei 450/620 nm in dem Wertebereich liegt, der auf dem beigefügten Datenblatt angegeben ist. Weichen die beiden Einzelmessungen um mehr als 20 % vom Mittelwert ab, muß der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muß bei 450/620 nm einen Extinktionswert < 0,3 aufweisen.

11.2. Auswertung über die Standardkurve

Um eine Auswertung mittels Standardkurve durchzuführen, muß zunächst über den Mittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) eine Korrektur der Tagesschwankung vorgenommen werden. Aus dem Sollwert der Standardkontrolle und dem aktuell gemessenen Wert der Kontrolle wird der Korrekturfaktor F berechnet. Der chargenabhängige Sollwert ist auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt.

$$F = \frac{\text{Sollwert der Standardkontrolle}}{\text{Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle}}$$

Mit dem Faktor F werden alle OD-Werte der Proben multipliziert. Mit diesen korrigierten Werten wird dann der entsprechende Unit-Wert in der Standardkurve abgelesen.

11.3. Auswertung über die Wertetabelle

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) bestimmt in der Wertetabelle die Spalte mit dem Wertebereich, der für die aktuelle Messung gültig ist. Innerhalb der Spalte wird der gemessene Extinktionswert der Probe dem passenden Extinktionsbereich zugeordnet und in der ersten Spalte von links der entsprechende Titer in IUnits/ml abgelesen.

IUnits/ml	Wertebereich der Standardkontrolle
	0,79 - 0,84
< 0,10	< 0,05
0,10 - 0,59	0,05 - 0,23
0,60 - 1,09	0,24 - 0,41
1,10 - 2,00	0,42 - 0,66
2,01 - 3,50	0,67 - 0,89
3,51 - 5,00	0,90 - 1,02
> 5,00	> 1,02

Abb. 1: Auszug aus einem chargenspezifischen Datenblatt

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle beträgt beispielsweise bei einer Messung 0,81. In diesem Fall ist für die Ermittlung des Ergebnisses die Spalte mit dem Bereich 0,79 bis 0,84 aus der Tabelle entscheidend. Eine Patientenprobe mit einem Extinktionswert von 0,48 liegt dann einem Titer-Bereich von 1,10 bis 2,00 IUnits/ml. (Die genannten Werte sind als Beispiel zu sehen und können von den aktuellen Werten des Datenblattes abweichen.)

11.4. Mathematische Auswertung

Die benötigten Werte für eine mathematische Auswertung nach der 4-Parameter-Auswertung oder der α-Methode sind auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt. Bei Fragen zur Anpassung des EIAs an Laborgeräte sowie zur mathematischen Auswertung stehen wir Ihnen gerne jederzeit unter folgender Rufnummer zur Verfügung: 0 61 51 / 81 02-0.

11.4.1. Hinweis zur Auswertung mit der α-Methode

Die angegebenen Parameter α und β geben IU-Werte aus, die auswertungsbedingt (z.B. im Bep III) um den Faktor 100 zu hoch sind. Die Endergebnisse müssen deshalb durch 100 geteilt werden, um die richtigen IU zu erhalten. Die mathematischen Gegebenheiten der α-Methode machen diesen Umstand notwendig.

11.5. Testergebnis

IU/ml	**Impfschutz**	**empfohlene Impfung**
< 0,1	keiner bzw. nicht sicher gewährleistet	Grund- od. Auffrischimpfung
0,1 - 0,5	vorhanden	Auffrischimpfung
0,6 - 1,0	ausreichend	Kontrolle in 2 Jahren
1,1 - 5,0	langfristig	Kontrolle in 5 - 10 Jahren
> 5,0	langfristig	Kontrolle in 10 Jahren

12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben darüber, ab welchem Antikörpertiter ein ausreichender Immunschutz besteht. Die in Pkt. 11.5. gemachten Angaben orientieren sich an der Publikation von Schröder et al. aus dem Jahre 1991. Die Autoren gehen in ihrer mit einem ELISA durchgeführten Studie, in der Humanseren untersucht wurden, davon aus, daß ab einem Wert von 0,1 IU/ml (internationale Einheiten pro ml) von einem Immunschutz ausgegangen werden kann, der aber erst ab 0,6 IU/ml ausreichend ist.

Im Gegensatz hierzu wurde aus Tierexperimenten abgeleitet, daß bereits ein Titer von 0,01 IU/ml als protektiv gewertet werden kann. Bei Befunden kleiner als 0,1 IU/ml sollte deshalb unter Berücksichtigung von dokumentierten, zurückliegenden Impfungen abgewägt werden, ob eine Auffrischimpfung oder eine Grundimmunisierung vorgenommen wird.

Bei Fragen zur Anpassung des EIAs an Laborgeräte sowie zur mathematischen Auswertung nach der 4-Parameter-Methode oder der α-Methode stehen wir Ihnen gerne jederzeit unter folgender Rufnummer zur Verfügung: 0 61 51 / 81 02-0. Die benötigten Werte für diese beiden Methoden sind auf dem beiliegenden Blatt mit der Wertetabelle vermerkt.

RIDASCREEN® Tetanus IgG

Enzyme immunoassay for the detection of
IgG antibodies against tetanus toxoid in serum

1. Intended use

The RIDASCREEN® Tetanus test is an enzyme immunoassay (EIA) for the detection of IgG antibodies against tetanus toxoid in human serum.

2. General

Tetanus (lockjaw) is caused by a toxin produced by Clostridium tetani. Like other Clostridia, Clostridium tetani is ubiquitous in soils. Clostridia occur as 1 µm diameter, 3 - 8 µm long, gram-positive rods, are sensitive to oxygen and are able to form spores. Many clostridia are apathogenic saprophytes but a few are characterized by their ability to form toxins, there being toxigenic and atoxigenic strains within any one species.
The neurotoxin produced by C. tetani is called tetanospasmin. After open wounds have become infected, the pathogen penetrates into the tissue where it multiplies anaerobically excreting the toxin. This then gains access to the central nervous system either via the blood or along the axons. Once there, the natural suppression of the motor neurons is blocked, inducing painful tension of the striated muscle.
Tonic cramps set in after an incubation time of 4 - 21 days, mostly in the muscles of mastication, and from there, they spread to the neck and trunk but rarely to the extremities. The course of the infection is acute in most cases and, if left untreated, ends in death by asphyxiation due to spasms of the inspiratory muscles. Using modern therapies, such as antitoxin, curare and valium, and active immunization therapies, the high mortality rate of 90 % can now be reduced to around 50 %.
Because immunization is carried out in infancy using a toxoid vaccine, the current incident rate in developing countries is only 1 per 1 million inhabitants. Vaccination should be carried out every 5 - 10 years. In cases where vaccine protection has already been carried out, those who are injured more than five years after their last vaccination should receive a booster as a precaution. Human antitoxin must be administered when the vaccination status is not clear.
The vaccination status can easily be determined using a modern ELISA, such as RIDASCREEN® Tetanus IgG EIA. The comparability of measured values is ensured by using a toxoid antigen and matching to international units.

3. Test principle

On the surface of the microtiter wells, tetanus toxoid is bound. Diluted serum samples and controls are pipetted into the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. Present antibodies bind to the immobilized antigen. Unbound material is removed in a washing step.
In a second step, a peroxidase-conjugated anti-human antibody (anti-IgG) is added. After incubation, unbound conjugate is removed by washing. Substrate (H_2O_2/TMB) is added to the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. The enzyme bound in the wells converts the colorless substrate to a blue color. Addition of stop solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength (reference wavelength ≥ 620 nm).

4. Reagents provided

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.
Each test kit contains:

1x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;
coated with tetanus toxoid;
in a resealable foil bag
1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);
Sample Diluent, ready to use;
contains 0.01 % Thimerosal
1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10x conc.);
Washing Buffer, contains 0.2 % Bronidox-L
1 x Standard Control (2.5 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01 % Thimerosal
1 x Negative Control (1.2 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01 % Thimerosal
1 x RIDASCREEN® SeroG HD (12 ml);
Anti-*human-IgG*-Conjugate;
peroxidase-conjugated antibody (rabbit);
ready to use
1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);
H_2O_2/tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml);
1 M sulfuric acid
1 x Instructions for use

5. Reagents required but not provided

5.1 Reagents

- Distilled or deionized water

5.2 Accessories

- Moist chamber at 37 °C
- Test tubes
- Vortex mixer
- Micropipets for volumes of 10 - 100 µl and 100 - 1000 µl
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Microplate washer or multichannel pipet
- Microplate reader (450 nm, reference wavelength ≥ 620 nm)
- Absorbent paper

6. Warnings and precautions for the users

The control sera (standard control and negative control) have been tested for HIV- and HCV-Ab as well as for HBsAg and were found to be negative. However, they as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

The standard control and the negative control as well as the sample diluent contain 0.01 % Thimerosal. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

The washing buffer contains Bronidox-L. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

Hydrogen peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The stop solution contains 1 N sulfuric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of the controls between kits of different lot numbers is not possible.

7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 - 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. Microbial contamination has to be avoided. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.
The diluted washing buffer (RIDASCREEN® SeroWP) can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.
Allow reagents and microwell strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 - 8 °C.
It is absolutely necessary to avoid contamination of the substrate (RIDASCREEN® SeroSC) with the conjugate solution, since this results in a coloration of the substrate. In the same way, the colorless substrate must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autoxidation. If the substrate has turned blue, the reagent should be discarded.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the colorless substrate prior to its use
- an absorbance value of the negative control at 450/620 nm > 0.3
- an absorbance value of the positive control at 450/620 nm out of the values given in the attached tables of values

9. Specimen collection and storage

The RIDASCREEN® Tetanus EIA has been evaluated for the investigation of human serum samples. Repeated freezing and thawing of the samples as well as microbial contamination must be avoided. The application of heat treated, lipemic, hemolytic, icteric or turbid samples can lead to wrong results.
The sample material can be stored for up to 1 week at 2 - 8 °C if the test cannot be carried out immediately. A prolonged storage of samples is possible at -20 °C.
Diluted samples can be used for up to 7 hours if they have been stored at 2 - 8 °C.

10. Test procedure

10.1. Preliminary comments

The RIDASCREEN® EIAs for serological antibody detection contain some test independent reagents. These reagents are labeled RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, SeroG HD, SeroSC, SeroStopp). They are not kit specific and can be changed between single test kits with correspondingly labeled reagents. But, this is not valid for the controls.
Bring all reagents and the microwell strips to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences. A deviation from the given incubation times and temperatures leads to an excessive difference of the standard control serum to the given target value, which is no longer covered by the determined area of values. During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow microwells to dry between steps.
Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.
Except the washing buffer, all reagents are ready to use.

10.2. Preparation of the washing buffer

1 part of the concentrated washing buffer (RIDASCREEN® SeroWP) is diluted with 9 parts of distilled water. Crystals in the buffer concentrate can be dissolved in a waterbath at 37 °C. Add 100 ml of the concentrated washing buffer to a

1000 ml graduated cylinder. Bring the final volume to 1000 ml with distilled or deionized water. The diluted washing buffer can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.

10.3. Preparation of the samples

Before starting the test, serum samples have to be diluted with the sample diluent (RIDASCREEN® SeroPP).

Dilution of the serum sample 1:100:

e.g. 10 µl serum + 990 µl sample diluent

Attention!
Negative control and standard control are ready to use and must not be diluted.

10.4. First incubation

After insertion of a sufficient number of cavities into the microwell holder, 100 µl of the diluted sera and ready to use controls are each added to the corresponding wells, the position A1 remains empty (blank). One negative control and two standard controls are carried along. The plate is incubated in a humid chamber at 37 °C for 30 min. The bottom of the cavities should not be in touch with materials that conduct temperature well (metal or wet paper).

A1	blank
B1	negative control
C1	standard control
D1	standard control
E1, F1	patient serum 1, 2, etc.

Attention!
The ELISA plate should not be placed in a cold incubation container which is heated to 37 °C during the incubation. The container must already be adapted to 37 °C prior to the incubation.

10.5. Washing

Decant or aspirate all microwells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the microwells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Then wash all wells 4 times with 300 µl of prepared washing buffer. Be sure to remove residual washing solution by firmly tapping the inverted microwells on absorbent paper after single washing steps.

If a microplate washer is used, take care that the washer is adjusted to the used microplate type.

10.6. Second incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroG HD (anti-*human-IgG*-conjugate) into the corresponding wells (including A1). Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber.

10.7. Washing

Wash 4 times according to step 10.5.

10.8. Third incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC into each well. Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber. Following the incubation, the reaction is stopped by adding 100 µl of RIDASCREEN® SeroStopp to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured in a microplate reader at 450 nm (reference wavelength ≥ 620 nm). Zero adjustment is done against the blank (position A1).

Remark:
To remove moisture, wipe the bottom of the microplate before measuring.

Summary of the test procedure

1. Bring all reagents to room temperature
2. Dilute the RIDASCREEN® SeroWP
3. Dilute the serum samples
4. Pipet 100 µl of the standard control, the negative control or the diluted samples into the microwells; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
5. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of washing buffer
6. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroG HD; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
7. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of washing buffer
8. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
9. After addition of 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp spectrophotometric determination at 450 nm (reference wavelength ≥ 620 nm)

11. Analysis

Analysis of the test can be done in three different ways:

1. using the standard curve enclosed
2. using the table of values (see data sheet enclosed)
3. mathematically by the 4-parameter calculation or the α-method

The blank (A1) must be subtracted from all OD values prior to the analysis.

11.1. Quality control

For the quality control, standard control (double determination) and negative control must be carried along with each test procedure. The test was carried out correctly if the mean absorbance value of the standard control at 450/620 nm corresponds to the value range of the data sheet enclosed. If the single measurements diverge from the mean absorbance value more than 20 %, the test must be repeated. The negative control must show an absorbance value at 450/620 nm < 0.3.

11.2. Analysis with the standard curve

If the analysis is to be carried out with the standard curve, first the daily variation must be corrected by a double determination of the standard control (see also pt. 11.1.). The correction factor F is calculated with the given target value of the standard control and the actually measured standard control value. The Lot-dependent target value is given on the data sheet enclosed.

$$F = \frac{\text{target value of the standard control}}{\text{mean absorbance value of the standard control}}$$

All OD values of the samples are multiplied by the factor F. With these corrected values, the corresponding Unit value is read from the standard curve.

11.3. Analysis with the table of values

The mean absorbance value of the standard control (see also pt. 11.1.) determines the column of the value range in the attached value table, which is decisive for the actual measurement. Within this column the measured absorbance value of the sample is classed to the suited absorbance range and the corresponding titer in IUnits/ml is read in the first column from the left.

IUnits/ml	range of standard control
	0.79 - 0.84
< 0.10	< 0.05
0.10 - 0.59	0.05 - 0.23
0.60 - 1.09	0.24 - 0.41
1.10 - 2.00	0.42 - 0.66
2.01 - 3.50	0.67 - 0.89
3.51 - 5.00	0.90 - 1.02
> 5.00	> 1.02

Fig. 1: Excerpt from a Lot dependent data sheet

The mean absorbance value of the standard control in a measurement is 0.81 for example. In this case, the column with the value range from 0.79 to 0.84 is decisive for result determination. Then, a patient sample with an absorbance of 0.48 lies in a titer range from 1.10 to 2.00 IUnits/ml. (The foregoing values are an example and can differ from the actual values of the Lot-dependent data sheet.)

11.4. Mathematical analysis

Needed values for a mathematical analysis by the 4-parameter calculation or the α-method are given on the data sheet enclosed.

11.4.1. Remark for the analysis with the α-method

The indicated parameter α and β show IU-values being too high by a factor of 100 due to the analysis (e.g. in Bep III). Therefore, the results have to be divided by 100 in order to reach the correct IU. The mathematical facts of the α-method cause these circumstances.

11.5. Test result

IU/ml	**immunization protection**	**recommended immunization**
< 0.1	no protection or not ensured	initial or booster immunization
0.1 - 0.5	existing	booster immunization
0.6 - 1.0	sufficient	control in 2 years
1.1 - 5.0	long-term	control in 5 - 10 years
> 5.0	long-term	control in 10 years

12. Remarks about the test procedure and interpretation

In the literature, there are various different pieces of information regarding the size of the antibody titer required to afford sufficient immune protection. The information given under section 11.5. is oriented towards the publication by Schröder et al. in 1991. In their study, in which they examined human sera using an ELISA, they assumed that immunization could start from 0.1 IU/ml (international units per ml), but protection would not be sufficient with titres less than 0.6 IU/ml.
In contrast to this, results from animal experiments suggested that even a titre of 0.01 IU/ml could be considered protective. However, for titers less than 0.1 IU/ml, an assessment must be made as to whether a basic immunization or a booster was carried out previously by taking into account the vaccinations documented.

Appendix

Literature

1. Holzner, H. (1978, Immunstatus nach Tetanus-Impfung, Fortschr. Med. 96 (13), pp. 680-683
2. Werner, G.T., et al, Tetanusimmunität im Alter, Zeitschrift für Gerontologie, 16, 130-133 (1983)
3. Seagesser, M., Spezielle chirurgische Therapie, 10. Aufl., Verlag Hans Huber, Bern 1987, pp. 1159-1165
4. Müller, H.E., et. al., Tetanus-Schutzimpfung-Indikation und Kontraindikation, Dtsch. med. Wsch. 113 (1988), 1326-1328
5. Enders, G. (1988), Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft, Urban & Schwarzenberg Verlag, Baltimore, pp. 260-262
6. Beaty, H.N., Tetanus. In: Harrison, Prinzipien der Inneren Medizin, Bd. 1, 11. Auflage, Schwabe & Co. AG Verlag, Basel 1989, pp. 662ff.
7. Schröder, J.P. et al., Vermeidung hyperergischer Reaktionen bei Tetanus-Impfungen durch Einsatz eines wissensbasierten Systems bei Fragen der Impfnotwendigkeit, Klin. Lab. 1992, 38: 229-233
8. Pietsch, M., Impfserologie zur Ergänzung von Impfungen, Der Allgemeinarzt 18/93