

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgG/IgA ELISA
(Y. enterocolitica IgG/IgA ELISA)

Nr zamówienia: EC142.00

Kod barwny: zielony metaliczny/przezroczysty

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim

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



Freigabedatum: 17.1.2019

REV 15 / VIROTECH Y. enterocolitica IgG/IgA ELISA PL

TreŚĆ

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. ZawartoŚĆ opakowania IgG / IgA	3
4. Przechowywanie i okres trwałoŚci zestawu testowego oraz gotowych do uŹycia odczynników	3
5. Środki ostroŹnoŚci i ostrzeŹnienia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezaŹnaczone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania.....	4
7.1 Materiały do badaŹ.....	4
7.2 Przygotowanie odczynników.....	5
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA	5
8. Ocena wyników badania	6
8.1 Kontrola badania	6
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schemat oceny IgG i IgA	6
8.4 Ograniczenia testu.....	6
9. Literatura	6
10. Schemat przebiegu badania	8

1. Cel zastosowania

Test VIROTECH *Yersinia enterocolitica* ELISA służy do jakościowego i półk ilościowego oznaczenia specyficznych przeciwciał IgG/IgA w surowicy ludzkiej, które s ą skierowane przeciwko antygenom 70kb plazmidu wirulentnego chorobotwórczych pałeczek *Yersinia*. Zastosowany antygen to mieszanina oczyszczonych natywnych Yops (*Yersinia* outermembrane proteins) i rekombinowanego YopB, YopD i YopE. Antygeny YopD i YopE okazały się zarówno w zakażeniach w IgG, IgM i IgA, jak również w reaktywnym zapaleniu stawów w IgA, antygenami immunodominującymi i umożliwiają tym samym pewną diagnostykę (11, 13, 14, 15). Stwierdzenie podwyższonych stężeń przeciwciał przyczynia się do diagnozy zapalenia stawów indukowanego *Yersinia*. Test ten nie jest przydatny do ustalenia rozpoznania ostrych schorzeń jelita.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydaza) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

Badania serologiczne powinny być przeprowadzane jako diagnostyka stopniowa. Jako 1 stopień zalecany jest test ELISA specyficzny dla klas Ig, ustawiony raczej wrażliwie. Jako 2 stopień należało przeprowadzić bardziej specyficzny *Yersinia enterocolitica* LINE w celu wykluczenia fałszywie pozytywnych wyników lub w celu potwierdzenia wyników pozytywnych.

3. Zawartość opakowania IgG / IgA

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 żłokliwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowane
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **IgA kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
8. **IgA kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
9. **IgA kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
10. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzastkowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
11. **koniugat IgA (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzastkowej z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
12. **tetrametylobenzidyna i roztwór substratu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gotowy do użycia
13. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszaninę kwasów

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych dołków pozostałe pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.

2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB służyć na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjść tylko potrzebny do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjątego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odrobny, lecz należy go usunąć.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrola	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płotka mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzzydina (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

1. Jako surowice kontrolne stosowane służyć tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązuje odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezawłączone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
3. mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. probówki
5. chusty z masy celulozowej
6. przykrywka płytek ELISA
7. pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
8. ręczna płytki ELISA lub automatyczna płytki mikropłytek
9. spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
10. inkubator

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiały badawcze

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.

2. Nie stosował próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i pływania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swojskie dla parametrów i wyłącznie z serii płytek podanych w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Ustawił inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdził, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadził do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzył opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do pływania dopełnił do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetował po 100 µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (Ślepa próba), kontroli negatywnej, kontroli cut-off i pozytywnej kontroli IgG i IgA oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (Ślepa próba, kontrola i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójne oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10 µl surowicy + 1 ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłogę z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołków.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołków dodać pipetami po 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, a upływy całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620 nm (referencyjna długość fali 620-690 nm). Ustawił tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzenia.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
 2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
 3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu.
- Takie postępowanie gwarantuje nienagane działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służy do pół ilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG i IgA, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągnięta jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{\text{(kontrola pozytywna)}} &= \frac{\text{OD}_{\text{(kontrola pozytywna)}}}{\text{OD}_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10 \\ \text{VE}_{\text{(surowica pacjenta)}} &= \frac{\text{OD}_{\text{(surowica pacjenta)}}}{\text{OD}_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schemat oceny IgG i IgA

Wynik (VE)	Ocena
< 9,0	negatywne
9,0 - 11,0	wartości graniczne
> 11,0	pozytywne

- Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są wyższe od zakresu granicznego, to próbki te są traktowane jako pozytywne.
- Jeżeli zmierzone jednostki VE znajdują się w podanym zakresie granicznym, nie występuje istotnie duże stężenie przeciwciał próbki są traktowane jako wartości graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakażenia konieczne jest oznaczenie zawartości przeciwciał dwóch próbek surowicy. Pierwsza próbka surowicy powinna być zbadana bezpośrednio po rozpoczęciu zakażenia, a druga próbka 5-10 dni później (surowica rekonwalescencyjna). Stężenie przeciwciał obydwóch próbek musi być oznaczone równolegle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest możliwa prawidłowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
- Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są niższe od zakresu granicznego, w próbce nie występują dające się zmierzyć specyficzne dla antygenów przeciwciała. Probki są traktowane jako negatywne.

8.4 Ograniczenia testu

- Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze badania do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
- Test ELISA *Yersinia enterocolitica* nie nadaje się do postawienia diagnozy ostrych schorzeń jelita cienkiego.
- Zarówno wyniki Western Blot IgA jak i IgG powinny być uwzględnione przy diagnozowaniu pacjentów z podejrzeniem *Yersinia*.

9. Literatura

- Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, 1997
- K. Ito et. al., „Colonization in the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*.” *Contrib Microbiol Immunol* 1991; 12: 63-7.
- Fachinformation Labkrone website, „*Yersinia*” (08/2010)

4. J. de Koning et. al., ðKlinik, Diagnostik und Therapie von Yersinia-enterocolitica-Infektionen.ðImmun. Infekt. 18 (6/90), 192-197.
5. H. Zeidler et. al, Yersinien-induzierte Arthritiden : Neue Erkenntnisse in Pathogenese,Diagnostik und Therapie.Rheumatologie-Hannover,WMW Nr.12, 1990 306-311
6. J-U Asmussen et.al,-Long term prognosis in Yersinia arthritis: clinical and serological findings.Annals of the Diseases 1992;51:1332-1334
7. Kern et. al., ðYersinia-enterocolitica-infektion mit extraintestinaler Manifestation: Fallbericht und Übersicht.ðZ. Gastroenterol 1994; 32: 152-156
8. www.rheuma-online.de ðYersinien-induzierte Arthritisð(06/2003)
9. Cornelis G.R. et. al.: ðThe virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome.ðMicrobiol-Mol-Biol-Rev. 1998 Dec; 62(4): 1315-52
10. The Journal of infectious diseases, Vol. 157, No. 3, March 1988, pages 601-602.
11. Stahlberg T. H., Granfors K., Toivanen A.: ðImmuno blot analysis of human IgM,IgG and IgA responses to plasmid encoded antigens of Yersinia enterocolitica serovar O3ðJ.Med.Microbiol.-Vol.24(1987),157-163.
12. Reviews of infectious diseases, Vol. 6, No. 3, May-June 1984, pages 421-422.
13. Gaede-K, Mack-D,Heesemann-J, ðExperimental Yersinia enterocolitica infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer ratsð Med Microbiol Immunol (1992)181;165-172.
14. Stahlberg T., Heesemann J., Granfors K., Toivanen A.: ðImmuno blot analysis of IgM, IgG and IgA responses to plasmid encoded released proteins of Yersinia enterocolitica in patients with or without yersinia triggered reactive arthritisðAnnals of the Rheumatic Diseases 1998; 48:577-581
15. Rastawicki W.: ðHumoral response to selected antigens of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis in the course of yersiniosis in humans. I. Occurrence of antibodies to Yersinia Yop proteins by Western-blotðMed Dosw Mikrobiol. 2006;58(4):321-8

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do pękania

Σ **Roztwór do pękania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

Σ **Rozcieńczenie próbki IgG / IgA w stosunku 1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczenia
(Roztwór do rozcieńczenia surowicy jest gotowy do użycia)

Wykonanie badania

