

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

objednací číslo : EC142.00

**barevné kódování : kovová zelená / průhledná**

**POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ**

**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 CZ

# Obsah

|                                                                                          |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Účel použití.....</b>                                                              | <b>3</b> |
| <b>2. Princip testu .....</b>                                                            | <b>3</b> |
| <b>3. Obsah soupravy IgG/ IgA.....</b>                                                   | <b>3</b> |
| <b>4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití.....</b> | <b>3</b> |
| <b>5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění .....</b>                               | <b>4</b> |
| <b>6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky).....</b>                           | <b>4</b> |
| <b>7. Testování .....</b>                                                                | <b>4</b> |
| 7.1 Testovaný materiál .....                                                             | 4        |
| 7.2 Příprava reagensů .....                                                              | 4        |
| 7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH.....                                                  | 5        |
| 7.4 Použití analyzátoru ELISA .....                                                      | 5        |
| <b>8. Vyhodnocení testu .....</b>                                                        | <b>5</b> |
| 8.1 Kontrola funkčnosti testu .....                                                      | 5        |
| 8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE) .....                                                 | 6        |
| 8.3 Schéma vyhodnocení IgG a IgA.....                                                    | 6        |
| 8.4 Limity testu.....                                                                    | 6        |
| <b>9. Literatura .....</b>                                                               | <b>6</b> |
| <b>10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata).....</b>                              | <b>8</b> |

## 1. Účel použití

Přespravek VIROTECH Yersinia enterocolitica ELISA slouží ke kvalitativnímu a semikvantitativnímu prokázání specifických protilátek IgG / IgA v lidském séru, které směřují proti antigenům 70kb virulentních plazmidů patogenních yersinií. U použitého antigenu se jedná o směs ořídých nativních yopů (Yersinia outer membrane proteins) a rekombinantního YopB, YopD und YopE. Antigeny YopD a YopE se osvědily jak u infekcí v IgG, IgM a IgA, tak i přes reaktivní artritidy v IgA jako imunodominantní antigeny a umožňují tak spolehlivou diagnostiku (11, 13, 14, 15). Důkaz zvýšené koncentrace protilátek přispívá k diagnóze artritidy indukované yersiniemi. Ke stanovení diagnózy akutních enteritických onemocnění není test vhodný.

## 2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoší s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté.

Sérologická vyšetření by měla být prováděna jako stupňovitá diagnostika. Jako 1. stupeň je vhodná analýza ELISA, specifická vzhledem k třídám Ig a spíše citlivě nastavená. Jako 2. stupeň by měla být následně proveden specifický titrační test Yersinia enterocolitica LINE k vyloučení nesprávně pozitivních výsledků, popř. k potvrzení pozitivních výsledků.

## 3. Obsah soupravy IgG/ IgA

1. 1 mikrotitrační destička, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. ředící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. IgG negativní kontrola, 1300μl, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. IgG hraniční kontrola, 1300μl, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. IgG pozitivní kontrola, 1300μl, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. IgA negativní kontrola, 1300μl, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
8. IgA hraniční kontrola, 1300μl, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
9. IgA pozitivní kontrola, 1300μl, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
10. IgG konjugát (anti-human), 11ml, (ovčí nebo ostrucha kšvořá) -kšeno-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, přespravený k použití
11. IgA konjugát (anti-lidský), 11ml, konjugát (ovčí nebo ostrucha kšvořá) s kšenovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS řetělní telecí sérum)
12. Substrátový roztok tetrametylbenzid (3,3',5,5'TMB), 11ml, ihned použitelné
13. Zastavovací roztok citrát, 6ml, obsahuje směs kyselin

## 4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagentů přespravených k použití

Soupravu skladujte přes teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagentů je vyznačena na přeslužném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem přes teplotě 2 - 8°C. Ihned po použití uskladněte opět přes teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě, že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vrátet zpět a musí být zlikvidován.

| Materiál        | Stav        | Skladování | Stabilita |
|-----------------|-------------|------------|-----------|
| zkušební vzorky | zředěný     | +2 až +8°C | max. 6h   |
|                 | nezředěný   | +2 až +8°C | 1 týden   |
| kontroly        | po otevření | +2 až +8°C | 3 měsíce  |

|                                |                                   |                                                                      |          |
|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------|
| mikrotitrační destička         | po otevření                       | +2 až +8° (skladování v souladu s dodaným sádku s vysoušecím sádkem) | 3 měsíce |
| revmatoidní faktor - absorbent | nežedlý, po otevření              | +2 až +8°C                                                           | 3 měsíce |
| konjugát                       | žedlý                             | +2 až +8°C                                                           | 1 týden  |
| tetramethylbenzidin (TMB)      | po otevření                       | +2 až +8°C (chráně před světlem)                                     | 3 měsíce |
| zastavovací roztok             | po otevření                       | +2 až +8°C                                                           | 3 měsíce |
| prací roztok                   | po otevření                       | +2 až +8°C                                                           | 3 měsíce |
|                                | po žednutí (připravený k použití) | +2 až +25°C                                                          | 4 týdny  |

## 5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

- Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a sledována negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Pěsto by měly být všechny vzorky, žedlé vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciální infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice.
- Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
- Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

## 6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

- Destilovaná/demineralizovaná voda
- Vícekanálová pipeta 50μl, 100μl
- Mikropipety: 10μl, 100μl, 1000μl
- Zkumavky
- Utěrky z buničiny
- Víčka na destičky ELISA
- Odpadkové koše na infekční materiál
- Ruční nebo automatická promývací ELISA mikrotitrační destičky
- Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
- Inkubátor

## 7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního postupu firmy VIROTECH Diagnostics.

### 7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Žedlí pacienti používejte vždy i první.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení.

- Používejte pouze první, nikoli inaktivovaná séra.
- Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešné pozitivní/negativní výsledky).

### 7.2 Příprava reagentů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysoký stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k žednutí a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny barvy a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně s barvami destiček uvedenou v certifikátu kontroly kvality.

- Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započetím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
- Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna i inidla temperována na pokojovou teplotu.

3. Všechny tekuté reagenty před použitím dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentrát před zředněním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepajte).

### 7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100μl zředěného pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgG a IgA, a následných sér pacienta. Doporučíme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředění séra pacienta : 1+100; např. 10μl sérum + 1ml zředěného pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destilka se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí 3x promývacím roztokem 350 - 400μl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100μl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po inkubaci konjugátu následuje 3x násobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100μl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50μl. Destilku opatrně a pečlivě protřepte poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně glazován zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty bylo odevzato od absorbancí kontrol a vzorků. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

### 7.4 Použití analyzátoru ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesoru ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístroje.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístroje, resp. při opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA přezkoušet a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Přezkoušení pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za 12 měsíců.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

## 8. Vyhodnocení testu

Okamžitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG a IgA protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výsledky podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosažena vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

### 8.1 Kontrola funkčnosti testu

a) Hodnoty optické hustoty

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15

Hodnoty optické hustoty negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické hustoty uváděné v certifikátu o kontrole kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i cut off kontrol by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) cut off kontrol jsou definovány 10 VE. Výsledné VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

## 8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\begin{aligned} \text{VE pozitivní kontrola} &= \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{hraniční hodnota}} \times 10 \\ \text{VE vzorek} &= \frac{\text{OD vzorek}}{\text{hraniční hodnota}} \times 10 \end{aligned}$$

## 8.3 Schéma vyhodnocení IgG a IgA

| Výsledek (VE) | Posouzení        |
|---------------|------------------|
| < 9,0         | negativní        |
| 9,0 - 11,0    | hraniční hodnoty |
| > 11,0        | pozitivní        |

- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uvažovaného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.
- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí v rozmezí hraničních hodnot (šedá zóna), vzorky se berou jako hraniční. Doporučuje se tyto vzorky opakovaně testovat z nového odběru. Pro bezpečné prokázání infekce je zapotřebí určit obsah protilátek ve dvou vzorcích séra. Jeden vzorek séra by měl být podroben testu bezprostředně po začátku infekce, druhý o 5 až 10 dní později (tzv. rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být zjišťovány paralelně, tj. v jedné testovací válce. Korektní diagnóza na základě vyhodnocení výsledku testu jediného vzorku není možná.
- Pokud jsou naměřené hodnoty menší než hraničního rozmezí, nejsou ve vyšetřovaném vzorku přítomné žádné antigenspecifické protilátky. Vzorky se považují za negativní.

## 8.4 Limity testu

- Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
- Přesrvek *Yersinia enterocolitica* ELISA není vhodný ke stanovení diagnózy akutních enteritických onemocnění.
- Jak výsledky IgA, tak i výsledky testu IgG Western Blot by měly být provedeny při diagnóze pacientů s podezřením na yersinie.

## 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 Labkrona website, „*Yersinia*“ (08/2010)
  - J. de Koning et. al., „Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen.“ *Immun. Infekt.* 18 (6/90), 192-197.
  - H. Zeidler et. al, *Yersinien-induzierte Arthritiden* : Neue Erkenntnisse in Pathogenese, Diagnostik und Therapie. *Rheumatologie-Hannover, WMW Nr.12, 1990* 306-311
  - J-U Asmussen et.al, „Long term prognosis in *Yersinia* arthritis: clinical and serological findings.“ *Annals of the Diseases* 1992;51:1332-1334
  - Kern et. al., „*Yersinia-enterocolitica*-infektion mit extraintestinaler Manifestation: Fallbericht und Übersicht.“ *ÖZ. Gastroenterol* 1994; 32: 152-156
  - [www.rheuma-online.de/yersinien-induzierte-Arthritis](http://www.rheuma-online.de/yersinien-induzierte-Arthritis) (06/2003)
  - Cornelis G.R. et. al.: „The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome.“ *Microbiol-Mol-Biol-Rev.* 1998 Dec; 62(4): 1315-52
  - The Journal of infectious diseases, Vol. 157, No. 3, March 1988, pages 601-602.
  - Stahlberg T. H., Granfors K., Toivanen A.: „Immunoblot analysis of human IgM, IgG and IgA responses to plasmid encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* serovar O3.“ *J. Med. Microbiol.* -Vol.24(1987), 157-163.
  - Reviews of infectious diseases, Vol. 6, No. 3, May-June 1984, pages 421-422.

13. Gaede-K, Mack-D, Heesemann-J, fExperimental Yersinia enterocolitica infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats Med Microbiol Immunol (1992)181;165-172.
14. Stahlberg T., Heesemann J., Granfors K., Toivanen A.: fImmunoblot analysis of IgM, IgG and IgA responses to plasmid encoded released proteins of Yersinia enterocolitica in patients with or without yersinia triggered reactive arthritis Annals of the Rheumatic Diseases 1998; 48:577-581
15. Rastawicki W.: fHumoral 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-blot Med Dosw Mikrobiol. 2006;58(4):321-8

## Příprava vzorků a promývacího roztoku

Σ **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

Σ **zředění vzorky IgG/IgA**  
**1:101**

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl šedícího roztoku na vzorek  
(šedící roztok na vzorek se používá pšmo)

## Schéma testu

