

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgG LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgG LINE-32)

Č. výrobku: WE242G32

(Y. enterocolitica IgG LINE-96)

Č. výrobku: WE242G96

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgA LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgA LINE-32)

Č. výrobku: WE242A32

(Y. enterocolitica IgA LINE-96)

Č. výrobku: WE242A96

POUZE PRO DIAGNOSTICKU IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Německo

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Webové stránky: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Obsah

1.	Určené použití.....	3
2.	Diagnostický význam.....	3
3.	Princip testu.....	3
4.	Obsah balení.....	4
4.1	Souprava pro 32 stanovení	4
4.2	Souprava pro 96 stanovení	4
5.	Skladování a stabilita testovacích souprav a komponent.....	4
6.	Bezpečnostní opatření a upozornění	5
7.	Další potřebný materiál (není součástí dodávky).....	5
8.	Vyšetřovaný materiál	5
9.	Postup testu.....	5
9.1	Příprava vzorků	5
9.2	Příprava reagensů	6
9.3	Postup imunoblotovacího testu	6
9.4	Použití zařízení pro imunoblot.....	7
10.	Interpretace výsledků	7
10.1	Použití cut-off kontroly	7
10.2	Význam antigenů	7
10.3	Interpretační kritéria	7
10.4	Omezení testu	8
11.	Funkční charakteristiky	8
11.1	Citlivost.....	8
11.2	Specifita a prevalence (očekávané hodnoty).....	9
11.3	Přesnost v rámci testu (opakovatelnost)	9
11.4	Preciznost mezi testy (reprodukovatelnost)	9
12.	Literatura.....	9
13.	Grafické značky	10
14.	Schéma testovacího postupu	11

1. Určené použití

Testovací souprava Line Immunoblot pro kvalitativní detekci specifických IgG/IgA protilátek v lidském séru, které jsou namířeny proti antigenům 70kb virulentního plazmidu patogenních bakterií rodu *Yersinia*. Detekce reaktivních pásů se používá v diagnostice následků infekce bakteriemi rodu *Yersinia* (např. reaktivní artritida). Test není vhodný pro diagnostiku akutních střevních onemocnění.

2. Diagnostický význam

Rod *Yersinia* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Společně s lidskými patogeny *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* a *Y. pseudotuberculosis* zahrnuje i další nepatogenní druhy (1).

Yersinie se vyskytují v mírném a subtropickém klimatickém pásu po celém světě. Nejvýznamnějšími bakteriálními rezervoáry *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis*, původců enterální yersiniózy, jsou latentní infekce u teplokrevných divokých a domácích zvířat (zejména domácích prasat), jejichž exkrementy kontaminují prostředí (2, 3). Přenos na člověka je převážně alimentární.

Infekce *Y. enterocolitica* se po inkubační době přibližně 14 dnů manifestuje převážně jako mezenterická lymfadenitida, která se klinicky projevuje jako enteritida, pseudoapendicitida, ileitida nebo kolitida (4). Mohou se také vyskytnout extramezenterické formy (20-30 % případů), lokální infekce po diseminaci, septické formy a uzlinový syndrom – s předchozí enteritidou nebo bez ní.

Reaktivní artritida (často u HLA B27 pozitivních pacientů) (5, 6) a erythema nodosum (7) patří mezi nejčastější imunopatologické komplikace infekcí *Y. enterocolitica*. Reaktivní artritida se obvykle objevuje po 1 až 3 týdnech bez příznaků, zejména v kloubech dolní poloviny těla [8].

Důležité faktory patogenity yersinií jsou vázány na přítomnost virulentního plazmidu, který mimo jiné kóduje sekretované proteiny spojené s virulencí, označované jako YOP (vnější membránové proteiny *Yersinií*).

Tyto YOP jsou produkovány pouze kmeny yersinií patogenními pro člověka (homologie sekvence DNA 70–100 %). Detekce protilátek proti těmto sekretovaným proteinům proto představuje vysoce specifickou a velmi citlivou metodou pro sérologickou diagnostiku všech forem yersiniózy (9).

V akutní fázi (10-14 dní po infekci) lze obvykle detekovat specifické protilátky (IgM, IgA a IgG) proti různým sekretovaným proteinům (10). Ne vždy se však tvoří protilátky proti všem yersiniovým antigenům. Ne vždy jsou také produkovány všechny třídy protilátek (11).

Protilátky třídy IgM se vyskytují v těsné časové souvislosti s klinickou manifestací možných imunopatologických komplikací (reaktivní artritida; erythema nodosum) a přetrvávají ve většině případů pouze 1–3 měsíce a pravidelně vymizí do 6 měsíců [12].

IgA odpověď je také důležitá, protože tato třída protilátek je téměř vždy detekovatelná u aktivní yersiniózy. Reaktivita IgA může trvat přibližně 2 – 6 měsíců, pokud je průběh nekomplikovaný. U chronické yersiniózy může reaktivita IgA přetrvávat 2–3 roky, v jednotlivých případech i déle (12). Odpovídající sérologické testy mají tedy smysl pouze v delších intervalech 4–6 měsíců. IgG protilátky přetrvávají řadu let.

Při testování německých dárců krve bylo možné protilátky IgG detekovat ve 41 % případů (16).

3. Princip testu

Proteiny patogenního antigenu jsou přenášeny na nitrocelulózovou membránu speciálním procesem rozprašování. Nitrocelulózová membrána se poté rozřeže na jednotlivé proužky.

Inkubace antigenem potažených nitrocelulózových proužků se vzorky lidského séra nebo plazmy umožňuje detekci specifických protilátek. Tyto protilátky vytvářejí imunokomplexy s antigenem fixovaným na testovacím proužku. Po odstranění nenavázaných protilátek v promývacích krocích jsou jednotlivé nitrocelulózové proužky inkubovány s protilátkami proti lidským IgG resp. IgA, konjugovanými s alkalickou fosfatázou. Po odstranění nenavázaných konjugovaných protilátek v dalším promývacím kroku se provede vizualizace komplexu antigen/protilátka (navázané protilátky) přidáním nebarevného substrátu, který tvoří modrofialové precipitáty na místech („antigenové pruhy“), kde se navázaly konjugované protilátky proti lidským protilátkám. Reakce enzym/substrát se zastaví promytím nitrocelulózových pásků destilovanou (deionizovanou) vodou. V závislosti na pozorovaném vzoru (patternu) pruhů lze interpretovat přítomnost specifických IgG resp. IgA protilátek.

4. Obsah balení

4.1 Souprava pro 32 stanovení

- | | | |
|---|----|------------|
| 1. Nitrocelulózové testovací proužky s antigenem naneseným rozprašováním (pevné proužky stabilizované na plastové fólii), utříděné do bookletu, k přímému použití | 2x | 16 proužků |
| 2. IgG resp. IgA Cut off kontrola, lidské sérum, předředěné | 1x | 1,0 ml |
| 3. Ředící/promývací pufr, pH 7,3 (10x konc.), s Tris a konzervační látkou | 2x | 50 ml |
| 4. Protilátka (koží) proti lidskému IgG resp. IgA (100x konc.) konjugovaná s alkalickou fosfatázou, s konzervační látkou | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrát (BCIP/NBT), k přímému použití | 1x | 57 ml |
| Záznamový list pro zápis a uložení výsledků | 1x | 1 kus |

4.2 Souprava pro 96 stanovení

- | | | |
|---|----|------------|
| 1. Nitrocelulózové testovací proužky s aplikovaným antigenem (pevné proužky stabilizované na plastové fólii), utříděné do bookletu, k přímému použití | 3x | 32 proužků |
| 2. IgG resp. IgA Cut off kontrola, lidské sérum, předředěné | 2x | 1,0 ml |
| 3. Ředící/promývací pufr, pH 7,3 (10x konc.), s Tris a konzervační látkou | 4x | 50 ml |
| 4. Protilátka (koží) proti lidskému IgG resp. IgA (100x konc.) konjugovaná s alkalickou fosfatázou, s konzervační látkou | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substrát (BCIP/NBT), k přímému použití | 3x | 57 ml |
| 6. Záznamový list pro zápis a uložení výsledků | 3x | 1 kus |

Na vyžádání také k dispozici:

IgG resp. IgA - pozitivní kontrola, lidské sérum, předředěné, 1,0 ml.

Znázornění pozitivních pruhů > Cut-off pruh naleznete v certifikátu přiloženém k soupravě.

(Č. výrobku.: IgG: WE242P60 resp. IgA: WE242P40)

IgG/IgA- negativní kontrola, lidské sérum, předředěné, 1,0 ml.

Negativní kontrola nevykazuje žádné pruhy nebo žádné pruhy relevantní pro hodnocení. > Cut-off pruh.

(Č. výrobku.: IgG/IgA: WE242N20)

5. Skladování a stabilita testovacích souprav a komponent

Testovací soupravu skladujte při teplotě 2–8 °C. Doba použitelnosti jednotlivých složek je uvedena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v certifikátu kontroly kvality.

1. Nevystavujte jednotlivé složky soupravy vysokým teplotám ani je nezmrazujte.
2. Nepoužívejte reagencie soupravy po uplynutí doby použitelnosti.
3. Během skladování nevystavujte reagencie silnému světlu.
4. Roztok BCIP/NBT substrátu je citlivý na světlo a musí být skladován ve tmě.
5. **Nitrocelulózové testovací proužky:** Proužky použijte ihned po vyjmutí ze sáčku. Sáček s nepoužitými proužky opět bezpečně uzavřete a uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Při ukládání výsledků do archivu dbejte na to, aby byly nitrocelulózové testovací proužky chráněny před přímým slunečním zářením, aby nedošlo k vyblednutí pruhů.

Materiál	Stav	Skladování	Doba použitelnosti
Testované vzorky	Neředěné	+2 až +8°C	1 týden
Testovací proužky	Po otevření	+2 až +8°C (uchovávané v dodaném sáčku)	3 měsíce
Kontroly	Po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
Konjugát	Po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	Naředěný	+2 až +8°C	cca 6 h

Substrát	Po otevření	+2 až +8 °C (chraňte před světlem)	3 měsíce
Promývací roztok	Po otevření	+2 až +8 °C (chraňte před světlem)	3 měsíce
	Konečné ředění (k přímému použití)	+2 až +8 °C	4 týdny
	Konečné ředění (k přímému použití)	nebo při pokojové teplotě	2 týdny

6. Bezpečnostní opatření a upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze séra, která byla testována jako negativní na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a na povrchový antigen hepatitidy B. Nicméně se všemi vzorky, naředěnými vzorky, kontrolami a konjugátem a také s proužky s antigenem je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Pro zacházení s produkty dodržujte laboratorní pokyny.
2. Při manipulaci s imunoblotem používejte plastové pinzety a noste ochranné rukavice.
3. Dodržujte platné místní předpisy pro likvidaci odpadu.
4. Inkubační vaničky jsou výrobcem určeny pro jednorázové použití. Opětovné použití inkubačních nádob je na vlastní riziko uživatele. Pokud mají být inkubační vaničky znovu použity, doporučujeme je po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného a poté důkladně opláchnout vodou z vodovodu a následně destilovanou nebo deionizovanou vodou.

7. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Inkubační miska (v případě potřeby k dispozici pod obj. č.: WE300.08)
2. Třepačka (vertikální, nikoli centrifugální)
3. Promývací láhev pro zastavení reakce
4. Pipeta nebo ruční promývačka
5. Mikropipety 5 µl - 1500 µl
6. Pipetová plnička
7. Zkumavky, objem 2-20 ml
8. Plastové pinzety
9. Destilovaná nebo deionizovaná voda
10. Filtrační papír

8. Vyšetřovaný materiál

Jako testovaný materiál lze použít sérum i plazmu, přestože v příbalovém letáku je uvedeno pouze sérum. Vzorky plazmy mohou obsahovat libovolný antikoagulant.

9. Postup testu

Přesné dodržování pracovního kódu je předpokladem pro získání správných výsledků.

9.1 Příprava vzorků

1. Pro přípravu každého vzorku je zapotřebí 15 µl séra nebo plazmy.
2. Vzorky krve je třeba odebrat odděleně venepunkcí. Sérum se oddělí po úplné koagulaci (neplatí pro plazmu). Pokud mají být séra skladována dlouhodobě, musí být zmrazena na -20 °C.
3. Zabraňte opakovaným cyklům zmrazování a rozmrazování.
4. Tepelně inaktivovaná, lipemická, hemolytická nebo mikrobiologicky kontaminovaná séra mohou vést k chybným výsledkům, a proto se nesmí používat.
5. Nepoužívejte zakalené vzorky (zejména po rozmrazení), v případě potřeby centrifugujte (5 minut při 1000 x g), pipetou odeberte čistý supernatant a použijte pro testování.

9.2 Příprava reagensií

1. Pro usnadnění rutinní laboratorní práce mohou být všechny testy řady LINE zpracovány společně v jednom testovacím běhu s použitím stejných inkubačních časů a stejných komponent – pokud jsou nezávislé na parametrech a šaržích. Cut off hodnoty kontrol jsou nyní specifické pro dané parametry a šarži.
2. Před přípravou ředění vytemperujte odpovídající koncentrát na pokojovou teplotu (20–25 °C). Používejte pouze vysoce kvalitní destilovanou/deionizovanou vodu, před použitím vytemperovanou na pokojovou teplotu (20–25°C).
3. Před zahájením testu daná ředění dobře promíchejte.
4. **Ředící/promývací pufr:**
Ředící/promývací pufr se dodává ve formě 10násobného koncentrátu. Zředte koncentrát ředícího/promývacího pufru v poměru 1:10 destilovanou nebo deionizovanou vodou (10 ml / 50 ml / 100 ml koncentrátu + 90 ml / 450 ml / 900 ml destilované nebo deionizované vody), dobře promíchejte. Jak koncentrovaný, tak i zředěný ředící/promývací pufr může mít žluté zbarvení. Toto zbarvení neovlivňuje stabilitu ředícího/promývacího pufru ani funkci či spolehlivost diagnostického testu.
5. **IgG-, resp. IgA konjugát**
Naředte konjugát 1 + 100 zředěným ředícím/promývacím pufrům a důkladně promíchejte. Pro každý vzorek séra je potřeba 1,5 ml pracovního roztoku konjugátu. Viz tabulka ředění konjugátu (viz také „Postup testu“)
6. **Substrátový roztok**
Substrátový roztok je určen k přímému použití.

9.3 Postup imunoblotovacího testu

Pozor: Nitrocelulózové testovací proužky mohou být testovány pouze ve schválené třídě Ig (viz štítek na bookletu daného testu a označení na každém jednotlivém testovacím proužku).

Pro správné provedení a vyhodnocení testů *Yersinia enterocolitica* LINE by měl každý testovací běh zahrnovat příslušné parametry a cut-off kontroly specifické pro danou šarži.

1. Test musí probíhat při pokojové teplotě.
2. Pro každý vzorek vložte 1 proužek do drážky čisté inkubační nádoby. Uchopte proužek pouze za vyznačený horní konec.
3. Napipetujte 1,5 ml připraveného **ředícího/promývacího pufru** a položte na třepačku. Dbejte na to, aby byly proužky antigenu důsledně ponořené, proužky nesmí během celého testovacího postupu vyschnout.
4. Během jedné minuty jsou proužky s antigenem dostatečně navlhčeny a mohou být inkubovány v poloze lícem nahoru, do strany nebo dolů.
5. Přidejte pipetou **15 µl séra nebo plazmy pacienta** nebo **100 µl cut-off nebo pozitivní/negativní kontroly**, pokud možno na horní označený konec proužku. Inkubujte sérum pacienta a kontrolu po dobu **30 minut** na třepačce. Ujistěte se, že během pipetování a následného vylévání nedochází ke křížové kontaminaci mezi jednotlivými vzorky pacientů.
6. Odsajte nebo opatrně vylijte veškerou kapalinu z drážek. Během vylévání kapaliny zůstávají proužky antigenu na dně drážky. Zbylou tekutinu osušte celulózovým papírem.
7. **Promývání proužků:** Inkubujte opakovaně s 1,5 ml připraveného ředícího/promývacího pufru po dobu **3 x 5 minut** na třepačce. Promývací pufr vždy úplně vylijte nebo odsajte. Před ukončením posledního promývacího kroku připravte potřebné množství čerstvého ředění konjugátu (viz tabulka).
8. Odsajte nebo zcela vylijte kapalinu z drážek (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml připraveného **ředění konjugátu** do odpovídající inkubační drážky a inkubujte 30 minut na třepačce.
10. Vylijte nebo zcela odsajte kapalinu z drážek.
11. **Promývání proužků:** Inkubujte opakovaně s 1,5 ml připraveného ředícího/promývacího pufru po dobu **3 x 5 minut** na třepačce. Promývací roztok vždy zcela vylijte nebo odsajte. Poté promyjte **1 x 1 minutu** destilovanou/deionizovanou vodou.
12. Vylijte nebo zcela odsajte kapalinu z drážek (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátového roztoku** k přímému použití do kanálků a inkubujte **10 ± 3 minuty** na třepačce.
14. **Zastavte** barevnou reakci vylitím substrátového roztoku. Poté proužky bez inkubace **3 x** promyjte 1,5 ml **destilované/deionizované vody**.

15. Vylijte destilovanou/deionizovanou vodu a nechte proužky oschnout na čistém celulóзовém papíru. Zbarvení pozadí, které lze pozorovat na vlhkých proužcích s antigenem, úplně zmizí poté, co proužky zcela oschnou. Úplné vyschnutí pevných proužků s antigenem trvá o něco déle než u běžných antigenových proužků.
16. K hodnocení použijte přiložený záznamový arch pro hodnocení. Pásky s vysokou specifikitou znázorněné na záznamovém listu usnadňují hodnocení vzorků pacientů.

Schéma postupu testu je uvedeno na poslední straně

9.4 Použití zařízení pro imunoblot

Pro automatické zpracování blotů a proužků řady LINE byly ověřeny následující přístroje: Apollo a Profiblot. V zásadě jsou vhodná všechna komerčně dostupná blotovací zařízení.

10. Interpretace výsledků

Pro bezpečné hodnocení je každý proužek LINE vybaven dvěma kontrolami:

1. Kontrola séra:

Pouze po inkubaci se sérem pacienta se pod značkou objeví sérový inkubační pruh.

2. Kontrola konjugátu:

Proužek LINE je opatřen kontrolním proužkem konjugátu, který se objeví po inkubaci s příslušným konjugátem.

Provedený test je platný, pokud je na vyvinutém nitrocelulóзовém testovacím proužku jasně viditelná kontrola séra i interní kontrola konjugátu.

Polohu proužku séra a kontrolního proužku konjugátu lze nalézt na záznamovém listu.

10.1 Použití cut-off kontroly

Pruhy s nižší intenzitou než YopD pruh cut off kontroly, nejsou do hodnocení zahrnuty.

Prevalenční pruh YopDD, který je aplikován pouze na IgG testovací proužky, není rovněž zahrnut do hodnocení. Pás YopDD $\geq$ než cut-off při negativní sérologii svědčí o předchozím kontaktu s Yersinií.

10.2 Význam antigenů

Antigen/ označení	Molekulová hmotnost	Význam antigenu	Specifita protilátek v testech řady LINE
YopM (2a)	48 kD	„Vnější membránové proteiny yersinií“ (Yop) jsou proteiny kódované plasmidem a uvolňované bakteriemi, tvořené všemi druhy yersinií, které jsou pro člověka patogenní.	Protilátky IgG a IgA proti „vnějším membránovým proteinům yersinií“ a V-Ag jsou vysoce specifické pro infekci patogenními yersiniemi.
YopH (2b)	45 kD		
YopB (3)	42 kD		
V-Ag (17)	38 kD		
YopD (4a)	36 kD		
YopE (5)	27 kD	Antigen V nebo také LcrV je řízen stejnými regulačními mechanismy jako proteiny Yop, pouze byl z historických důvodů pojmenován jinak.	

U Salmonella thyphimurium, Campylobacter jejuni nebo Brucella nedochází ke zkříženým reakcím (13, 14).

Pruh YopDD (poslední pruh na testovacím proužku), který je přítomen pouze na proužku IgG, není zahrnut do hodnocení.

Pruh YopDD spojený s negativním nálezem o intenzitě $\geq$ než cut-off svědčí o předchozím kontaktu s Yersinií.

10.3 Interpretační kritéria

Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zohledňovat klinický obraz, epidemiologická data a všechny další dostupné laboratorní nálezy.

Pattern pruhů	Význam	Hodnocení
Bez pruhů ≥ cut-off pruh	Žádné sérologické upozornění na infekci bakteriemi rodu <i>Yersinia</i> nebo prodělanou yersiniózu.	Negativní
Jeden pruh ≥ cut-off pruh (mimo YopD)	Protilátky proti <i>Yersinii</i> jsou detekovatelné. Oslabená reakce při rekonvalescenci nebo přetrvávající protilátky nebo právě začínající infekce. Doporučuje se následná kontrola.	Suspektní
izolovaný YopD (36 kD) ≥ cut-off pruh	Detekovatelné protilátky proti <i>Yersinii</i> . U více než 90 % pacientů s <i>Yersinií</i> se vyvinou IgA protilátky proti YopD. Může se také jednat o nedávnou infekci nebo přetrvávající protilátky.	Pozitivní
Dva pruhy ≥ cut-off pruh	Detekovatelné protilátky proti <i>Yersinii</i> . Pravděpodobná infekce. IgG- and IgA- mohou přetrvávat několik let.	Pozitivní
YopDD (prevalence) ≥ cut-off pruh	Pruh pozitivní prevalence. Indikuje předchozí kontakt s bakteriemi rodu <i>Yersinia</i>	

Je-li to možné, je třeba k posouzení výsledků IgA zvážit také výsledky IgG, protože silné intenzity pruhů a velký počet pruhů v testu IgG a IgA jsou typickým sérologickým obrazem reaktivní artritidy vyvolané yersiniemi (8).

Test *Yersinia enterocolitica* LINE je specificky upraven v rozsahu IgG tak, aby byly detekovány pouze čisté titry. Pruh YopDD prevalence, který ukazuje na předchozí kontakt s *Yersinií*, naznačuje obecnou prevalenci IgG.

10.4 Omezení testu

- Výsledky testu IgA i IgG LINE by měly být zohledněny v diagnostice pacientů s podezřením na yersiniovou infekci.
- IgA protilátky mohou po úspěšné léčbě přetrvávat 6 měsíců až 3 roky. IgG protilátky běžně přetrvávají řadu let.
- Zkřížené reakce se sérem proti *Pseudomonas aeruginosa* sice nehrají žádnou roli v diferenciální diagnostice, nelze je však teoreticky vyloučit. Funkčně podobné „sekreční mechanismy typu III“ [YopB a YopD homologní k PopB a PopD] lze nalézt u *P. aeruginosa*, což je oportunní patogen, který normálně infikuje pouze imunologicky oslabené jedince (18, 19).
- Yersinia enterocolitica* LINE test není určen k diagnostice akutních střevních onemocnění.
- Ve vzácných případech mohou séra pacientů vykazovat „inverzní“ pruhy (tmavé pozadí, bílé pruhy), které není možné vyhodnotit, což znamená, že imunoblot v těchto případech nelze interpretovat. Takové sérum by mělo být vyšetřeno jinými sérologickými metodami.

11. Funkční charakteristiky

11.1 Citlivost

Citlivost byla stanovena testováním klinicky charakterizovaných sér v testu *Yersinia enterocolitica* LINE a testováním rekombinantního antigenu Yop D v referenčním testu ELISA.

Citlivost

Kombinovaná séra (n=84)

Yersinia enterocolitica IgG Line Immunoblot	Yersinia enterocolitica Yop D ELISA		
	negativní	suspektní	pozitivní
negativní	12	1	0
suspektní	2	0	0
pozitivní	5	1	63

Yersinia enterocolitica IgA Line Immunoblot	Yersinia enterocolitica Yop D ELISA		
	negativní	suspektní	pozitivní
negativní	17	4	3
suspektní	2	0	0
pozitivní	11	2	45

Citlivost pro Yersinia enterocolitica je > 99,9 % u testu IgG Line Immunoblot a 93,8 % u testu IgA Line Immunoblot. Suspektní séra nebyla při výpočtu zohledněna.

11.2 Specificita a prevalence (očekávané hodnoty)

Specificita byla stanovena testováním krevních dárcovských sér v testu Yersinia enterocolitica LINE.

Yersinia enterocolitica IgG Line Immunoblot (séra dárců krve, n=69)	
pozitivní	8
suspektní	1
negativní	60

Yersinia enterocolitica IgA Line Immunoblot (séra dárců krve, n=87)	
pozitivní	9
suspektní	2
negativní	76

Specificita je 88,2 % pro Yersinia enterocolitica IgG Line Immunoblot a 89,4 % pro IgA Line Immunoblot. Yop DD vykazuje míru prevalence > 40 % v IgG. Suspektní séra nebyla při výpočtu zohledněna.

11.3 Přesnost v rámci testu (opakovatelnost)

Opakovatelnost byla stanovena inkubací 32 nitrocelulózových testovacích proužků v rámci šarže testu se sérem pro IgG a IgA. Pruhy v každém případě vykazovaly stejnou intenzitou po celé nitrocelulózové fólii.

11.4 Preciznost mezi testy (reprodukovatelnost)

Reprodukovatelnost byla stanovena testováním 3 sér. Stanovení bylo provedeno s použitím 10 různých šarží testu pro 3 testované subjekty. Byla použita tato séra: negativní sérum, sérum s vysokou intenzitou pruhů a cut-off kontrola. Uvedené sérologické hodnoty se přesně shodovaly ve všech nezávislých testech.

12. Literatura

1. Psychrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, 1997
2. K. Ito et. al., "Colonization in the tonsils of swine by Yersinia enterocolitica." Contrib Microbiol Immunol 1991; 12: 63-7.
3. Fachinformation Labkrone website, "Yersinia" (08/2010)
4. J. de Koning et. al., "Klinik, Diagnostik und Therapie von Yersinia-enterocolitica-Infektionen." Immun. 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., "Yersinia-enterocolitica-infektion mit extraintestinaler Manifestation: Fallbericht und Übersicht." Z. Gastroenterol 1994; 32: 152-156
8. www.rheuma-online.de "Yersinien-induzierte Arthritis" (06/2003)
9. Cornelis G.R. et. al.: "The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome." Microbiol-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. Auli Toivanen et. al.,-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.
12. Reviews of infectious diseases, Vol. 6, No. 3, May-June 1984, pages 421-422.
13. Gaede-K, Mack-D, Heesemann-J, "Experimental 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. Ståhlberg T.H., J. Heesemann, K. Granfors, A. Toivanen, (1989) : Immunoblot 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, 48: 577-581
15. Peter J.B. et. al.: Use and Interpretation of Laboratory Tests in Infectious Disease", Specialty Laboratories, 1998. 262-64
16. Mäki-Ikola, O., J. Heesemann, A. Toivanen, K. Granfors.: High frequency of Yersinia antibodies in healthy populations in Finland and Germany, Rheumatol. Int., 1997, 16:227-229
17. Straley S.C. et al.: Yops of Yersinia spp. pathogenic for humans, Infection and Immunity, Aug 1993: 3105-3110
18. Schneewind O. et al.: Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals, Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Oct 26;96(22):12839-43.
19. Forsberg A. et.al.: Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of Pseudomonas aeruginosa and Yersinia pseudotuberculosis. Mol Microbiol. 1998 Sep;29(5):1155-65.

13. Grafické značky



=> viz návod k použití!

14. Schéma testovacího postupu

Testovací postup ve zkrácené verzi

Inkubace vzorků	30 minut	15 µl sérum pacienta / plasma / 100 µl kontrola vždy v 1,5 ml ředícího/promývacího pufru
Promývání	3 x 5 minut	vždy s 1,5 ml ředícího/promývacího pufru
Inkubace s konjugátem	30 minut	s 1,5 ml v pracovním ředění (1 + 100)
Promývání	3 x 5 minut 1 x 1 minuta	vždy s 1,5 ml ředícího/promývacího pufru s destilovanou/deionizovanou vodou
Inkubace se substrátem	10 ± 3 minut	vždy s 1,5 ml substrátového roztoku
Zastavení	3 x bez inkubace	vždy s destilovanou/deionizovanou vodou

Tabulka ředění konjugátu (zaokrouhleno)

Počet proužků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ředící/promývací pufr	1,5 ml	3,0 ml	4,5 ml	6,0 ml	7,5 ml	9,0 ml	11,0 ml	12,0 ml	14,0 ml	15,0 ml
Konjugát - koncentrát	15 µl	30 µl	45 µl	60 µl	75 µl	90 µl	110 µl	120 µl	140 µl	150 µl
Konečný objem	1,515 ml	3,03 ml	4,545 ml	6,06 ml	7,575 ml	9,09 ml	11,11 ml	12,12 ml	14,14 ml	15,15 ml

Počet proužků	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ředící/promývací pufr	17,0 ml	18,0 ml	20,0 ml	21,0 ml	23,0 ml	24,0 ml	26,0 ml	27,0 ml	29,0 ml	30,0 ml
Konjugát - koncentrát	170 µl	180 µl	200 µl	210 µl	230 µl	240 µl	260 µl	270 µl	290 µl	300 µl
Konečný objem	17,17 ml	18,18 ml	20,2 ml	21,21 ml	23,23 ml	24,24 ml	26,26 ml	27,27 ml	29,29 ml	30,3 ml

Počet proužků	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ředící/promývací pufr	32,0 ml	33,0 ml	35,0 ml	36,0 ml	38,0 ml	39,0 ml	41,0 ml	42,0 ml	44,0 ml	45,0 ml
Konjugát - koncentrát	320 µl	330 µl	350 µl	360 µl	380 µl	390 µl	410 µl	420 µl	440 µl	450 µl
Konečný objem	32,32 ml	33,33 ml	35,35 ml	36,36 ml	38,38 ml	39,39 ml	41,41 ml	42,42 ml	44,44 ml	45,45ml

Počet proužků	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Ředící/promývací pufr	47,0 ml	48,0 ml	50,0 ml	51,0 ml	53,0 ml	54,0 ml	56,0 ml	57,0 ml	59,0 ml	60,0 ml
Konjugát - koncentrát	470 µl	480 µl	500 µl	510 µl	530 µl	540 µl	560 µl	570 µl	590 µl	600 µl
Konečný objem	47,47 ml	48,48 ml	50,5 ml	51,51 ml	53,53 ml	54,54 ml	56,56 ml	57,57 ml	59,59 ml	60,6 ml