MASTAZYME YERSINIA

Enzymatická imunoesej pro detekci a kvantifikaci lidských protilátek IgG/IgM a IgA proti Yersinia enterocolitica v séru a plasmě

Návod k použití

Pouze pro *in-vitro* diagnostiku

Test	Kód	Kit pro
MASTAZYME YERSINIA IgG	681251	12 x 8 testů
MASTAZYME YERSINIA IgM	681252	12 x 8 testů
MASTAZYME YERSINIA IgA	681253	12 x 8 testů

Skladujte při 4 – 8˚C

Obsah	Strana
1. Použití	3
2. Úvod	3
3. Princip testu	3
4. Součásti soupravy	4
5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	5
6. Upozornění a zvláštní opatření	5
7. Uchovávání a trvanlivost reagencií	6
8. Odběr vzorku	6
9. Pracovní postup	6
10. Interpretace výsledků	7
11. Charakteristika testu	8
12. Literatura	8

1. Použití

Souprava MASTAZYME YERSINIA (Y. enterocolitica) antibody ELISA je určena pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek IgG / IgM / IgA proti Yersinia enterocolitica v séru a plasmě. Na vyžádání je možné test provádět i v dalších tělních tekutinách.

Tento test je určen pouze pro použití *in-vitro*.

Všechny výsledky testu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními klinickými ukazateli. Pro správnou klinickou interpretaci musí být vzaty v úvahu i výsledky dalších laboratorních testů.

2. Úvod

Patogenní bakterie Yersinia pestis, Y. pseudotuberculosis, Y. enterocolitica a Y. ruckeri patří k rodu Yersinia, který je součástí rodiny enterobacteriaceae. Všechny lékařsky důležité druhy jsou intracelulární parazité, kteří způsobují charakteristický zánět lymfatické tkáně v průběhu onemocnění.

Yersinia enterocolitica proniká do těla pacienta orálně a typickými symptomy infekce jsou terminální ileitis a průjem. V diferenciální diagnostice je často velmi složité odlišit tyto klinické příznaky od apendicitidy. V průběhu opožděné imunologické reakce se mohou objevit extraintestinální příznaky jako jsou erythema nodosum, uveitis a arthritis. Předpokládá se, že příčinou reaktivní arthritidy způsobené Yersiniemi je lokální syntéza protilátek v kloubech (synoviální tekutině).

Yersinie mohou být bez problémů charakterizovány po izolaci v čisté kultuře standardními bakteriálními testy. Pro lidská onemocnění jsou nejzásadnější sérotypy O3, O8 a O9. Byla popsána i zkřížená reaktivita s Brucellou, což je nutné brát do úvahy při diferenciální diagnostice.

Klasickou sérologickou detekční metodou byla vždy Widalova reakce. Stále populárnějšími metodami jsou HAT, KFR a také ELISA. ELISA je charakterizována vysokou sensitivitou, ale také možností rozlišení IgG a IgA / IgM protilátek. Pokud je podezření na arthritické onemocnění, imunoglobulinové třídy IgA a IgM by měly být považovány jako kritérium pro posuzování jeho aktivního průběhu.

Díky imunologické podobnosti s thyrotropním receptorem může být test použit také pro konfirmaci autoimunitní Gravesovy nemoci. Western Blot, jako konfirmační test s možností identifikace jednotlivých bakteriálních proteinů a možností vyloučení zkřížené reaktivity, se ukázal jako úspěšný.

3. Princip testu

Princip testu může být popsán ve čtyřech fázích.

3.1 Inkubace séra

Specifické protilátky se váží k antigenům, které jsou na pevné fázi, a tím vzniká stabilní imunokomplex. Po 60-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě jsou jamky promyty předem zředěným promývacím pufrem, čímž se odstraní všechny nereaktivní komponenty v séru.

3.2 Inkubace s konjugátem

Anti-lidský –IgG / -IgM / -IgA konjugát s křenovou peroxidázou je přidán do každé jamky.

Konjugát se váže k protilátkám IgG, IgM či IgA (respektive k antigenu na pevné fázi) a vytváří se tak stabilní „sandwich˝. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě je přebytečný konjugát odstraněn promytím každé jamky promývacím pufrem.

3.3 Reakce se substrátem a její zastavení

Do každé jamky je přidán TMB substrát a v reakci mezi ním a enzymem peroxidázou vznikne stabilní modrý chromogen. Reakce s následnou tvorbou zabarvení je zastavena po 20-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě přidáním 0.5 M H_2SO_4 do jamek. Změna pH způsobí, že se modrá barva chromogenu změní na žlutou.

3.4 Vyhodnocení a interpretace

Intenzita zbarvení je vyhodnocena v readeru při 450 nm (doporučená referenční vlnová délka pro bichromatické měření: 600 – 690 nm). Intenzita zbarvení (OD) je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek v séru pacienta.

4. Součásti soupravy

Souprava se skládá z reagencií pro 12 x 8 = 96 stanovení. Mikrotitrační destičky a roztoky musí být skladovány při teplotě 4 – 8 ˚C. Datum expirace je uvedeno na štítku.

12 destiček Mikrotitrační destičky jednotlivé destičky obsahují 8 jamek s navázaným antigenem Yersinia enterocolitica (Yops H, M, B, D, E, N a LcrV)

1 x Držák

4 x 2 mL Kalibrátory 1 – 4 lidské sérum s obsahem protilátek proti Y. enterocolitica (koncentrace viz tab.) zředěné v PBS a stabilizované 0,01 % methylisothiazolonem a 0,01 % bromonitrodioxanem, připraveny k použití

		IgG	IgM	IgA
Kal. 1 (negativní)	Koncentrace (U/mL)	1	1	1
Kal. 2 (cut-off)		10	10	10
Kal. 3 (slabě pos.)		45	30	50
Kal. 4 (positivní)		180	110	200

1 x 60 mL Sérum diluent roztok PBS/BSA pufrů, obsahuje < 0,1 % azidu sodného jako konzervantu, připraven k použití

1 x 12 mL Roztok HRP konjugátu HRP-značené kozí anti-lidské –IgG /-IgM /-IgA protilátky, připraven k použití

1 x 12 mL TMB substrát 3,3´,5,5´ Tetramethylbenzidin, připraven k použití

1 x 12 mL Stop roztok 0,5 M kyselina sírová, připraven k použití

1 x 60 mL Promývací pufr roztok PBS/Tween pufrů 10x koncentrovaný, naředit 1:10 před použitím, koncentrát může být zahřát až do 37˚C po dobu 15 min. k zabránění vzniku krystalů

2 x	Fólie na přikrytí destiček	na přikrytí mikrotitračních destiček během inkubace
1 x	Plastový obal	znovu-uzavíratelný pro skladování nepoužitých destiček v suchém prostředí

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- 5 µL-, 100 µL- a 500 µL mikro- a multikanálové pipety
- ELISA reader se 450 nm filtrem (referenční filtr 600 – 690 nm)
- Promývač mikrotitračních destiček (v případě manuálního promývání: promývací lahev)
- Zkumavky na ředění sér pacientů
- Odměrný válec
- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality

6. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Séra, plasmy a pufry této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami a jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV. Nicméně z preventivních důvodů je nutné při práci používat ochranné latexové rukavice.
- Skvrny způsobené séry či reagenciemi musí být důkladně odstraněny za použití desinfekčních roztoků (např. 5% chlornan sodný).
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagencie vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24˚C).
- Před použitím je nutné reagencie důkladně, ale jemně promíchat např. krouživými pohyby. Vyhněte se třepání, které vede k následné tvorbě pěny.
- Aby byly zajištěny stejné podmínky testu ve všech jamkách mikrotitrační destičky, je nutné pipetovat reagencie ve stejných intervalech.
- Před použitím reagencií se ujistěte, zda není uzávěr či lahvička poškozena a nedošlo tím k možné kontaminaci. Vyvarujte se vzájemného smíchání reagencií. Protože jsou reagencie často citlivé k oxidaci, je nutné nechávat lahvičky s nimi otevřené pouze po krátkou dobu.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety.
- Není možné míchat či jinak používat reagencie ze stejných souprav o jiné šarži.
- Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace.
- V souladu se Správnou Laboratorní Praxí (SLP) a ISO 9001 by měly být veškeré laboratorní pomůcky a přístroje používané pro provedení testu prověřeny z hlediska přesnosti. Toto se týká především pipet, promývacích a čtecích zařízení (ELISA readerů).

- Vyhněte se kontaktu určitých reagencií, a to především stop roztoku a substrátu, s pokožkou, očima a sliznicemi. Hrozí zde riziko podráždění, poleptání a intoxikace.

7. Uchovávání a trvanlivost reagencií

Všechny reagencie skladujte při teplotě 4 – 8 ˚C.

Datum expirace každé reagencie je uvedeno na štítku lahvičky. Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace. Naředěný promývací pufr je stabilní až 4 týdny, pokud je skladován při teplotě 4 – 8 ˚C.

8. Odběr vzorku

Pro stanovení se používá sérum nebo plasma (EDTA, heparin). Sérum je po vysrážení centrifugací odděleno od krve, která byla asepticky odebrána venepunkcí. Vzorky séra či plasmy se skladují při teplotě 4 – 8 ˚C po dobu max. 48 hodin. Po delší dobu mohou být vzorky skladovány při teplotě -20 ˚C. Po rozmražení vzorky znovu nezmrazujte. Lipemické, hemolytické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešnou pozitivitu či falešnou negativitu výsledků.

Pacientská séra musí být předředěna **sérum diluentem v poměru 1:101** (např. 5 µL séra + 500 µL sérum diluentu).

Vzorky s koncentrací protilátek přesahující hodnotu koncentrace v nejvyšším (nejkoncentrovanějším) kalibrátoru musí být dále zředěny sérum diluentem.

V případě interference s revmatoidními faktory je doporučeno preabsorbovat sérum Rf absorbentem (MASTSORB kat. č. 651003). Rf absorbent **nepoužívejte** na kalibrátory.

9. Pracovní postup

9.1 Příprava reagencií

Před použitím nechte všechny součásti soupravy a také vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24 ˚C), reagencie jemně promíchejte.

Promývací pufr: Rozpusťte krystalky, které se mohou v lahvičce vyskytovat, zahřátím na teplotu 37 ˚C, a poté jemně promíchejte.

Nařeďte koncentrovaný promývací pufr v poměru **1:10 destilovanou vodou** (např. 60 mL koncentrovaného pufru + 540 mL destilované vody). Důkladně promýchejte.

- Pro správné provedení testu je nutné důsledně postupovat podle přiložených instrukcí. Veškeré změny a modifikace jsou v rámci odpovědnosti uživatele.
- Všechny reagencie a vzorky musí být před použitím při pokojové teplotě, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.
- Kalibrační křivka by měla být sestrojena při každém testu.
- Nepoužité mikrotitrační destičky vložte zpět do plastového obalu a uchovávejte je v suchu při teplotě 4 – 8 ˚C.

9.2 Provedení testu

Připravte si dostatečné množství jamek v mikrotitračních destičkách pro kalibrátory, kontroly a vzorky.

Poznámka: Je možné využít i jiné inkubační podmínky. V případě změn v doporučeném pracovním postupu (např. inkubace při teplotě 37˚C místo pokojové teploty) musí uživatel validovat takovéto provedení testu.

1. Pipetujte **100 µL** naředěného vzorku (1:101) a kalibrátorů do příslušných jamek.
2. Překryjte destičku fólií na překrývání destiček a **inkubujte** při pokojové teplotě po dobu **60-ti minut.**
3. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a **3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru.** Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
4. Pipetujte **100 µL roztoku HRP konjugátu** do každé jamky.
5. Překryjte destičku fólií na překrývání destiček a **inkubujte** při pokojové teplotě po dobu **30-ti minut.**
6. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a **3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru.** Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
7. Pipetujte **100 µL TMB substrátu** do každé jamky.
8. Překryjte destičku fólií na překrývání destiček a **inkubujte po dobu 20 minut ve tmě** při pokojové teplotě.
9. Přidejte **100 µL stop roztoku** do každé jamky.
10. Po důkladném promíchání a vysušení dna mikrojamek **změřte optickou hustotu při 450 nm** a vypočítejte výsledky. Blank měřte proti vzduchu. Je doporučeno bichromatické měření za využití referenčních vlnových délek 600 – 690 nm.

    Vytvořené zbarvení je stabilní alespoň 60 minut. Měřte optické hustoty během této doby.

10. Interpretace výsledků

Příklad

	OD 450 nm	upravená OD	střed. hodnota OD
Blank	0.020		
Kalibrátor 1 (negativní)	0.030 / 0.034	0.010 / 0.014	0.012
Kalibrátor 2 (cut-off)	0.520 / 0.580	0.500 / 0.560	0.530
Kalibrátor 3 (slabě pozitivní)	1.100 / 1.132	1.080 / 1.112	1.096
Kalibrátor 4 (pozitivní)	1.500 / 1.590	1.480 / 1.570	1.525

Výše uvedená data v tabulce mohou být považována za příklad, který byl dosažen při určité teplotě a okolních podmínkách. Tato data **nepopisují** referenční hodnoty, kterých je možné dosáhnout v různých laboratořích stejným způsobem!

10.1 Kvalitativní hodnocení

Vypočítané hodnoty OD pro séra pacientů jsou porovnávány s hodnotami cut-off kalibrátoru. Jestliže je hodnota vzorku vyšší, pak je vzorek považován za pozitivní.

Jestliže je hodnota vzorku nižší než hodnota cut-off kalibrátoru, pak je vzorek považován za negativní. Považuje se za rozumné definovat tzv. „šedou zónu“ v rozmezí ± 20% od cut-off hodnoty. Je doporučeno opakovat vyšetření za využití stejného séra či nového vzorku od stejného pacienta odebraného po 2 – 4 týdnech, pokud se hodnoty vzorku nacházejí v této „šedé zóně“. Oba vzorky je možné testovat paralelně.

Hodnota absorbance pozitivního kalibrátoru musí být minimálně dvojnásobná v porovnání s hodnotou cut-off kalibrátoru.

10.2 Kvantitativní hodnocení

V soupravě obsažené kalibrátory jsou připraveny k použití a koncentrace protilátek jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách (U/mL). Tímto je umožněna přesná a reprodukovatelná kvantifikace a v důsledku toho je možné monitorovat titry protilátek v séru pacienta. Hodnoty koncentrací pro jednotlivé kalibrátory jsou uvedeny na štítcích příslušných lahviček.

Kalibrační křivka může být sestrojena na milimetrovém papíře vynesením středních hodnot absorbancí kalibrátorů na osu y a odpovídajících hodnot jejich koncentrací na osu x. Následně mohou být koncentrace protilátek v séru pacienta odečítány přímo z takového grafického zobrazení.

Výpočet výsledků může být také proveden za využití počítače s odpovídajícím softwarem.

11. Charakteristika testu

Charakteristiky ELISA testů MASTAZYME YERSINIA IgG / IgM / IgA byly stanoveny a posouzeny v souladu s Evropskými IVD direktivami. Detailní validační data mohou být poskytnuta na zvláštní přání.

12. Literatura

1. Bottone, EJ (ed.): Yersinia enterocolitica. CRC Press, Boca Raton (1981).
2. Brubaker, RR. The genus Yersinia: biochemistry and genetics, Curr. Top. Microbiol. **57**: 111 (1972).
3. Butler, T. Plague and other Yersinia infections, Plenum Publishing Corp., New York (1983).
4. Heesemann, J et al. Experimental Yersinia enterocolitica infections; a model for human yersiniosis, APMIS **101**: 417 (1993).
5. Kittelberger, R et al. Serological cross-reactivity between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica, Vet. Microbiol. **47**: 271 (1995).

6. Luo, G et al. Purification and characterization of Yersinia enterocolitica proteins, J. Immunol. **152**: 2555 (1994).

7. Möaki-Ikola, O et al. Yersinia-specific antibodies in serum and synovial fluid, Ann. Rheum. Dis. **53**: 535 (1994).