

Yersinia IgG ELISA

Yersinia IgA ELISA



Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen plasmidcodierte Yersinien-Proteine in Humanserum im Rahmen der Arthritis-Diagnostik.

Yersinia IgG ELISA Kit **Best. Nr. V-YEEGOK**
Yersinia IgA ELISA Kit **Best. Nr. V-YEEAOK**

Packungsgröße: 96 Teste / 1 Mikrotiterplatte, teilbar in Einzelnöpfe
Probenmaterial: ca. 20 µl Serum
Lagerung/Haltbarkeit: ca. 12 Monate bei 2-8 °C
Testdauer: ca. 90 Minuten

Kitinhalt

| | | |
|-----|----|---|
| 1 | | Antigen-beschichtete Mikrotiterplatte (Coated Assay Plate), 96 Nöpfe; Einzelnöpfe |
| 2,0 | ml | Kalibrator-Kontrolle (Calibrator Control), human, gebrauchsfertig |
| 1,0 | ml | Positiv-Kontrolle (Positive Control), human, gebrauchsfertig |
| 1,0 | ml | Negativ-Kontrolle (Negative Control), human, gebrauchsfertig |
| 12 | ml | IgG-, bzw. IgA-spezifisches Konjugat (HRP-Anti-Human Conjugate), Antihumanglobulin von der Ziege, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, gebrauchsfertig |
| 25 | ml | Probenpuffer (Sample Buffer), gebrauchsfertig |
| 60 | ml | Waschpuffer (Wash Buffer), 20fach Konzentrat |
| 12 | ml | Chromogen/Substratlösung (TMB Substrate Solution), gebrauchsfertig |

Erforderliches Reagenz, das nicht im Kit enthalten ist:

Stopplösung: Schwefelsäure (H₂SO₄): 0,2 N (= 0,1M), alternativ: Phosphorsäure (H₃PO₄): 3N (=1M)

Lagerung und Haltbarkeit

Ungeöffneter Kit Haltbar bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum; nach Gebrauch sofort wieder in den Kühlschrank legen.

Mikrotiternöpfe Ungeöffnet haltbar bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum; nach dem Öffnen der Folie nicht benötigte Nöpfe mit Trocknungsmittel luftdicht verschlossen aufbewahren; bei 2-8 °C ca. 8 Wochen verwendbar.

Waschpuffer

- Konzentrat: Haltbar bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum.
 - Gebrauchsverdünnung: Ca. 8 Wochen haltbar bei 2-8 °C. Bei längerer Aufbewahrung pH-Wert überprüfen (7,2 ± 0,1).

Übrige Reagenzien

Ungeöffnet haltbar bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum.
 Geöffnet ca. 4 Wochen haltbar bei 2-8 °C.

Vorbereiten der Reagenzien

| | Teste | Waschpuffer-Konzentrat | plus | Aqua dest. | Endvolumen |
|---|-------|------------------------|------|------------|------------|
| Waschpuffer | | | | | |
| - Gebrauchsverdünnung: | 16 | 10 ml | + | 190 ml | 200 ml |
| Konzentrat mit Aqua dest. 1:20 verdünnen: | 32 | 20 ml | + | 380 ml | 400 ml |
| | 48 | 30 ml | + | 570 ml | 600 ml |
| | 64 | 40 ml | + | 760 ml | 800 ml |
| | 80 | 50 ml | + | 950 ml | 1000 ml |
| | 96 | 60 ml | + | 1140 ml | 1200 ml |

Yersinia IgG ELISA, Yersinia IgA ELISA

- 2 -

Stopplösung (0,2 N Schwefelsäure):

Verdünnung verschiedener H₂SO₄ - Konzentrationen zu einer gebrauchsfertigen 0,2 N Stopplösung. 200 ml Stopplösung reichen für 20 Mikrotiterplatten. Haltbarkeit unbegrenzt.

| H ₂ SO ₄ Ausgangs-konzentrationen | Aqua dest. | plus | Milliliter | Endvolumen |
|---|------------|------|------------|------------|
| 1 M = 2 N | 180,0 ml | + | 20,0 ml | 200 ml |
| 0,5 M = 1 N | 160,0 ml | + | 40,0 ml | 200 ml |
| 96% | 199,0 ml | + | 1,0 ml | 200 ml |
| 90% | 198,8 ml | + | 1,2 ml | 200 ml |
| 40% | 196,2 ml | + | 3,8 ml | 200 ml |
| 25% | 193,4 ml | + | 6,6 ml | 200 ml |

Stopplösung (3 N Phosphorsäure):

Verdünnung verschiedener H₃PO₄ - Konzentrationen zu einer gebrauchsfertigen 3 N = 1 M Stopplösung. 200 ml Stopplösung reichen für 20 Mikrotiterplatten. Haltbarkeit unbegrenzt.

| H ₃ PO ₄ Ausgangs-konzentrationen | Aqua dest. | plus | Milliliter | Endvolumen |
|---|------------|------|------------|------------|
| 89% | 187,4 ml | + | 12,6 ml | 200 ml |
| 85% | 186,5 ml | + | 13,5 ml | 200 ml |

Übrige Reagenzien: Gebrauchsfertig.

Vorbereiten der Patientenproben (Serumverdünnungen der Patientenproben):

Die Patientenserum werden in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt; z.B.: 10 µl Patientenprobe mit 200 µl Probenpuffer mischen, pro Ansatz werden 100 µl verdünnte Patientenprobe benötigt.

Arbeitsvorschrift

Vor dem Ansatz alle Testkomponenten und Proben auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen und **direkt vor Gebrauch** durch 4-5maliges Schwenken gut mischen, nicht schütteln und Schaumbildung vermeiden.

- Benötigte Anzahl Mikrotiternäpfe in den Gitterrahmen spannen:**
 - 1 Negativ-Kontrolle
 - 2 Kalibrator-Kontrollen
 - 1 Positiv-Kontrolle
 - Patientenproben

Vor dem Entnehmen der Näpfe die Streifen von unten mit der Hand lockern. Es werden Näpfe für je 1 negative, 2 Kalibrator-, 1 positive Kontrolle und für die Patientenproben benötigt. Ein nicht beschichteter Napf kann als Blank-Wert angesetzt werden. Die nicht benötigten Mikrotiternäpfe **zusammen mit dem Trockenreagenz** sofort luftdicht verschließen und in den Kühlschrank legen.
- Je 100 µl Kontrollen bzw. vorbereitete Patientenproben zupipettieren**

Kontrollen und Proben in die Mikrotiternäpfe pipettieren. Für den Blank-Wert 100 µl Probenpuffer in einen nicht-beschichteten Napf pipettieren. Die Proben sollten innerhalb von 10 Minuten verteilt werden.
- 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren**

Näpfe mit Folie abdecken. Bei Raumtemperatur (20-25 °C) **Platte stehen lassen**, nicht schütteln oder schwenken.
- 5 x waschen:**
 - Flüssigkeit absaugen
 - je 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung pipettieren
 - Puffer gut absaugen

Ohne Zwischeninkubation.
- Näpfe auf Saugpapier gut ausklopfen**

Nach letztem Absaugvorgang Näpfe auf Saugpapier gut ausklopfen. Näpfe nicht trocknen lassen.
- Je 100 µl Konjugat pipettieren**
- 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren**

Näpfe mit Folie abdecken. **Platte stehen lassen**, nicht schütteln oder schwenken.
- 5 x waschen wie in Punkt 4 und 5**
- Je 100 µl Chromogen-/Substratlösung pipettieren**

Bei mehr als 2 Streifen mit der 8-Kanalpipette pipettieren. Positive Proben färben sich blau.
- 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren**

Platte mit Folie abdecken und **im Dunkeln stehen lassen**, nicht schütteln oder schwenken.
- Je 100 µl Stopplösung zupipettieren**

In der gleichen Reihenfolge wie die Chromogen-/Substratlösung pipettieren. Positive Proben färben sich gelb.
- Messung im Photometer bei 450 nm**

Bei 0,2N Schwefelsäure sofort, spätestens innerhalb von 5 Minuten, bei 3N Phosphorsäure sofort, spätestens innerhalb von 10 Minuten messen. Messwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm. Evtl. mit Blank-Wert korrigieren.

Testprinzip

Mit dem Yersinia ELISA ist es möglich, Yersinia-spezifische Antikörper in humanen Seren nachzuweisen.

Spezifische Antikörper binden während der Seruminkubation das fixierte Antigen im Napf. Während der Konjugatreaktion bindet das HRP-Konjugat an den Antigen-Antikörper-Komplex. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) setzt das Chromogen/Substrat (TMB) um und färbt die Reaktionslösung blau an. Nach Abstoppen der Reaktion mit 0,1M oder 0,2N Schwefelsäure bzw. 3N

oder 1M Phosphorsäure erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion der Gelbfärbung wird bei 450 nm gemessen und die Streuung bei 620 nm. Die Waschschritte nach der Seruminkubation und Konjugatinkubation entfernen ungebundene Reagenzien. Das Mitführen der Kalibrator-Kontrolle und die daraus resultierenden Ratiowerte korrigieren Schwankungen von Laborparameter (z.B. Temperatur usw.) in gewissen Grenzen.

Auswertung

Gültigkeit des Testlaufs

Ein Testlauf ist gültig, wenn die Werte bzw. Mittelwerte der Kontrollen in folgenden Bereichen liegen:

| | |
|--|-------------------|
| Extinktion der negativen Kontrolle: | < 0,250 |
| Mittelwert der Extinktionen des Kalibrators: | > 0,300 und ≤ 1,6 |
| Extinktion der positiven Kontrolle: | > 0,500 |

Grenzwertbestimmung (Cut off)

1. Mittelwert der Extinktionen des Kalibrators berechnen (Ext. _{Kal}).

2. Cut off-Berechnung:

Diesen Mittelwert mit dem chargenspezifischen Faktor multiplizieren; der Faktor ist auf dem Kit-Etikett angegeben: $\text{Cut off} = \overline{\text{Ext.}}_{\text{Kal}} \times \text{Faktor}$

Qualitative Auswertung der Proben

| Extinktion | Bedeutung | Beurteilung |
|-----------------|-----------|---|
| Probe < Cut off | Negativ | Es sind keine spezifischen Antikörper gegen plasmidcodierte Yersinien Proteine nachweisbar. |
| Probe ≥ Cut off | Positiv | Es sind spezifische Antikörper gegen plasmidcodierte Yersinien Proteine nachweisbar. |

Proben, deren Extinktionen bis zu 10% über oder unter dem Cut off liegen, gelten als grenzwertig und sollten nochmals getestet werden.

Quantitative Auswertung der Proben (Quantifizierung mittels Ratio)

Mit Hilfe der Ratio können Proben-Ergebnisse quantifiziert und Titerverläufe zwischen zwei Proben eines Patienten erfasst werden. Die Ratio-Berechnung erlaubt es, Ergebnisse aus verschiedenen Testläufen und aus verschiedenen Chargen zu vergleichen.

1. Berechnung des Cut off-Wertes wie oben.

2. Extinktion der Probe dividiert durch den

Cut off-Wert ergibt die Ratio.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{Cut off}}$$

Beurteilung der Proben

IgG ELISA

| Ratio | Bedeutung | Beurteilung |
|------------|-----------|---|
| < 0,9 | Negativ | Keine IgG Antikörper gegen plasmidcodierte Proteine von Yersinien nachweisbar. |
| 0,9 - 1,10 | Auffällig | Bei wiederholt auffälligem Ergebnis, Titerverlauf mit einem zweiten Serum ca. 14 Tage später überprüfen oder Serum im Yersinia ViraStripe® IgG untersuchen. |
| ≥ 1,10 | Positiv | IgG Antikörper gegen plasmidcodierte Proteine von Yersinien nachweisbar. Eine Bestätigung im Yersinia ViraStripe® IgG ist empfehlenswert. |

IgA ELISA

| Ratio | Bedeutung | Beurteilung |
|------------|-----------|--|
| < 0,9 | Negativ | Keine IgA Antikörper gegen plasmidcodierte Proteine von Yersinien nachweisbar. Besteht weiterhin klinischer Verdacht auf eine akute Yersinien Infektion, zweite Probe ca. 10 Tage später untersuchen und im Yersinia ViraStripe® auf IgG und IgA Antikörper untersuchen. |
| 0,9 - 1,10 | Auffällig | Bei wiederholt auffälligem Ergebnis, Titerverlauf mit einem zweiten Serum ca. 14 Tage später überprüfen oder Serum im Yersinia ViraStripe® IgA untersuchen. |
| ≥ 1,10 | Positiv | IgA-Antikörper gegen plasmidcodierte Proteine von Yersinien nachweisbar. Eine Bestätigung und Differenzierung im Yersinia ViraStripe® IgA ist empfehlenswert. |

Steigerung der Sensitivität

Bedarfsweise kann die Empfindlichkeit des Yersinia IgG ELISA, bzw. Yersinia IgA ELISA erweitert werden, um auch sehr schwache Titer zu erfassen. Diese Proben gelten zwar noch nicht als positiv, können aber als auffällig angesehen werden. Hierfür gilt als Grenze der **Reaktive cut off**, mit dem keine Ratio gebildet wird!

Berechnung des Reaktiven Cut off:

Der Reaktive Cut off wird durch Multiplizieren des Cut off mit 0,75 errechnet.

$$\begin{aligned} \text{Reaktiver Cut off} &= \text{Cut off} \times 0,75 \\ &= \overline{\text{Ext.}}_{\text{Kal}} \times \text{Faktor} \times 0,75 \end{aligned}$$

Auswertung der Proben unter Einbeziehung des Reaktiven Cut off

| Extinktion der Probe | Ratio | Bedeutung |
|---------------------------------|--------------|-----------|
| < Reaktiver Cut off | < 0,75 | Negativ |
| Reaktiver Cut off bis < Cut off | 0,75 - < 1,0 | Auffällig |
| ≥ Cut off | ≥ 1,0 | Positiv |

Beurteilung der Proben unter Einbeziehung des Reaktiven Cut off

| Ratio | Bedeutung | Beurteilung |
|-------------|-----------|--|
| 0,75 - <1,0 | Auffällig | 3 Fälle sind möglich: a) sehr frühes Infektionsstadium mit steigendem Titer, b) Resttiter einer länger zurückliegenden Infektion, c) nicht Yersinien-spezifische Reaktion, z.B. durch polyklonale Stimulierung. Weitere Abklärung: Charakterisierung mit dem Yersinia ViraStripe® IgG, IgA anschließen, bzw. den Titerverlauf mit einer zweiten Probe nach 2 Wochen überprüfen |

Leistungsmerkmale

Die Datenzusammenstellung zur analytischen sowie diagnostischen Sensitivität und Spezifität, Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit des Tests erhalten Sie gerne auf Anfrage.

Hinweise zur Handhabung der Teste

1. Alle Kitreagenzien müssen direkt vor Gebrauch durch 4-5maliges, vorsichtiges Schwenken gut durchmischt werden; nicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Proben, die mit Hitze vorbehandelt wurden, hämolytisch, ikterisch, lipämisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu falsch positiven Ergebnissen führen.
3. Unverdünnte Proben können für den IgG- und IgA-Nachweis bis zu 7 Tagen bei 2-8 °C aufbewahrt werden, für längere Lagerung in Aliquots bei -20 °C einfrieren. Proben für den IgM-Nachweis können bis zu 3 Tagen bei 2-8 °C aufbewahrt werden. IgM-Proben nicht mehr als einmal einfrieren.

4. In vitro-Diagnostika dürfen nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden, da zuverlässige Ergebnisse dann nicht mehr gewährleistet sind. Die Komponenten der Kits sind als Einheit getestet, Reagenzien fremder Herkunft oder verschiedener Chargen dürfen, sofern nicht extra angegeben, nicht ausgetauscht werden.
5. Arbeitsanleitungen immer genau beachten, andernfalls ist die Zuverlässigkeit der Testergebnisse nicht gewährleistet.
6. Nur destilliertes oder entionisiertes Wasser hoher Qualität verwenden.
7. Kontamination zwischen Konjugat und Substrat vermeiden, für diese beiden Reagenzien nie die gleichen Gefäße verwenden.

Vorsichtsmaßnahmen/ Sicherheitsvorkehrungen

1. Alle humanen Serumkomponenten wurden auf HCV-, HIV1-, HIV2-Antikörper und HBs-Antigen untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kitkomponenten, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös betrachtet und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. Beim Arbeiten Einweg-Handschuhe tragen.
4. Am Arbeitsplatz nicht essen, trinken oder rauchen.
5. Kontrollen sowie Probenpuffer enthalten bis zu 0,25% Thimerosal als Konservierungsmittel. **Achtung:** Gesundheitsschädlich. Nach Haut- bzw. Augenkontakt mit reichlich Wasser abwaschen bzw. ausspülen. Giftig beim Verschlucken! (siehe Sicherheitsdatenblätter). R20/21/22-33; S1/2-13-28-36.

6. Das Chromogen enthält Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) und ist cancerogen. Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Berührung mit Haut und Augen sofort mit viel Wasser nachwaschen.
7. Die Stopplösung ist 1 M Phosphorsäure oder 0,2 N Schwefelsäure. Berührung mit Haut und Augen vermeiden. Bei Berührung mit Haut und Augen sofort mit viel Wasser nachwaschen.
8. Proben und alle möglicherweise kontaminierten Materialien sowie flüssige infektiöse Abfälle sind gemäß allgemein anerkannten Labortechniken zu dekontaminieren, z.B. durch ein mindestens 15-minütiges Autoklavieren bei 121°C bei feuchter Hitze. Zur Entsorgung flüssiger Abfälle können diese z.B. mit Natriumhypochlorit in einem Volumenverhältnis gemischt werden, so dass das Endgemisch 1% Natriumhypochlorit enthält. Zur vollständigen Desinfektion 30 Minuten stehen lassen.

Hinweise zur Handhabung der Konjugate für die Viramed-ELISAs

1. Die Konjugate müssen Raumtemperatur (20-25 °C) erreichen. Nach Konjugatentnahme Fläschchen sofort in den Kühlschrank stellen.
2. Die Konjugate möglichst steril behandeln. Nicht mehrmals mit derselben Pipettenspitze direkt aus dem Konjugatfläschchen pipettieren. Möglichkeiten zur Konjugatentnahme:
- Mit der Multipette die benötigte Konjugatmenge entnehmen und das Konjugat auf die Nöpfe verteilen.
- Für jede neue Entnahme aus der Originalflasche eine frische Pipettenspitze verwenden.
- Für den gesamten Testansatz benötigte Konjugatmenge auf einmal entnehmen und in ein extra Gefäß geben. Von dort aus das Konjugat auf die Platte verteilen.

Überschüssiges Konjugat nicht in das Originalfläschchen zurückgeben!

3. Die Konjugate nur in der Originalflasche oder in ungebrauchten Polypropylen-Fläschchen aufbewahren.
4. Gefäße und Pipetten, mit denen die Konjugate in Berührung kommen, müssen frei von Detergenzien, Natriumhypochlorit oder **Stopplösung** (H₂SO₄) sein.
5. Die Laborluft muss frei von aggressiven Dämpfen sein; z.B. darf während der Testdurchführung kein Natriumhypochlorit, das die Konjugate inaktiviert, offen im Labor stehen.

Hinweise zur Beurteilung

1. In seltenen Fällen kann es bei jedem ELISA-Test zu unspezifischen Reaktionen kommen, die jedoch methodisch bedingt nicht von spezifischen Reaktionen zu unterscheiden sind.
2. Ein einzelnes ELISA-Ergebnis reicht daher grundsätzlich nicht für einen endgültigen Befund aus. Die Diagnosestellung kann nur unter Berücksichtigung sämtlicher serologischer und klinischer Daten, nie

anhand eines einzelnen Laborparameters, erfolgen. ELISA-Ergebnisse sollten immer mit einem Bestätigungstest z.B. dem Yersinia ViraStripe® IgG, IgA abgesichert werden.

3. Seren von Patienten, die unter immunsuppressiver Therapie stehen, können im ELISA unspezifische Ergebnisse zeigen. Sie sollten daher stets mit einem weiteren Bestätigungstest nachuntersucht werden.

Literatur

1. CREMER J. et. al., Electrophoresis (1993).
2. STÄHLBERG T. et. al., Ann. Rheum. Dis. (1989).
3. DE KONING et al., J. Infect. Dis. (1989).
4. BOTTONE, Clin. microbiol. Rev. (1997).
5. HOOBKAMP-KORSTANJE et al., Infection (1992).
6. GRANSFORS et al., J. Infect. Dis. (1980).