

# Seraline<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG Seraline<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA

Line Immunoassay zum Nachweis von IgG oder IgA Antikörpern gegen *Yersinia enterocolitica*  
in humanem Serum oder Plasma

REF LIA-005-6 G ▽ 20 REF LIA-005-6 G-12 ▽ 12x 20 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE  
REF LIA-005-6 A ▽ 20 REF LIA-005-6 A-12 ▽ 12x 20 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · [www.seramun.com](http://www.seramun.com)  
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com)

## Einführung

Yersinien sind gramnegative Stäbchen und gehören zur Familie der Enterobacteriaceae. Innerhalb der Gattung *Yersinia* unterscheidet man die 3 humanpathogenen Arten *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Von *Y. enterocolitica* sind über 60 Serovarietäten bekannt (6).

Alle humanpathogenen Yersinien besitzen das 70 kb-Virulenzplasmid, welches für Proteine im Zytosol, in der äußeren Membran und für Exoproteine kodiert (2,8). Die hauptsächlichen Virulenzmarker, auch als Yop (*Yersinia* outer proteins) bezeichnet, sind hochimmunogen (3,4). Nach Kontakt mit diesen Virulenzfaktoren werden Antikörper der Klassen IgA, IgG und IgM gebildet. Nach einigen Monaten sinken die IgM und IgA Titer ab. Antikörper der Klasse IgG persistieren im Allgemeinen über mehrere Jahre. Bei immunpathologischen Komplikationen und chronischen Yersiniosen bleiben auch IgA Antikörper über einen längeren Zeitraum nachweisbar (1).

Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 7, maximal 10 Tage. Die Erreger werden meist durch kontaminierte Lebensmittel (Fleisch und Wurstwaren) und seltener durch Direktkontakt übertragen. Das Erregerreservoir umfasst viele Säugetierarten, wobei Nager, Haus- und Nutztierarten von besonderer epidemiologischer Bedeutung sind (6).

Die klinischen Symptome einer Infektion mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* weisen Ähnlichkeiten auf. Bei Kleinkindern führt eine Infektion mit *Y. enterocolitica* häufig zu einer selbstlimitierenden Gastroenteritis mit Fieber und Erbrechen. Bei Jugendlichen manifestieren sich Infektionen mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* meist als Lymphadenitis mit starken Bauchschmerzen, die eine akute Appendizitis vortäuschen können. Yersiniosen bei Erwachsenen

können darüber hinaus zu Ileitis und Kolitis führen. Häufig kommt es auch zu immunpathologischen Komplikationen in Form von reaktiver Arthritis (HLA-B27-assoziiert) und Erythema nodosum (8).

#### Literatur:

1. Cremer, J., Putzker, M., Faulde, M., Zöller, L., Immunoblotting of *Yersinia* plasmid-encoded released proteins: A tool for serodiagnosis, *Electrophoresis* 1993, 14: 952-959
2. Iriarte, M., Cornelis, G.R, Identification of SycN, YscX, and YscY, Three new elements of the *Yersinia* Yop Virulon, *J. Bacteriol.* 1999, 181/2: 675-680
3. Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N., Laufs, R., Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media *Infect. Immun.* 1986, 54/2: 561-567
4. Heesemann, J., Grüter, L., Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells *FEMS Microbiol. Lett.* 1987, 40, 37-41
5. Kendrick, C.J., Baker, B., Morris, A.J., O'Toole, P.W., Identification of *Yersinia*-infected blood donors by anti-Yop IgA immunoassay, *Transfusion*, 2001, 41: 1365-1372
6. Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J., Pulverer, G., Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie Gustav Fischer Verlag Stuttgart Jena New York, 1994, 7. Auflage
7. Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., Stainier, I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62/4, 1315-1352
8. Paerregaard, Interaction between *Yersinia enterocolitica* and the host with special reference to virulence plasmid encoded adhesion and humoral immunity *Dan. Med. Bull.* 1992, 39/2, 155-172

## Anwendungsbereich

Der *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von IgG oder IgA Antikörpern gegen die Yersinia outer proteins (Yops) von *Yersinia enterocolitica* in humanem Serum oder Plasma.

## Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten. Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

### Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1 : 101 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

### Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (anti-human-IgG, oder -IgA oder -IgM) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

### Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um. Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Alternativ können die Teststreifen mit der Evaluierungssoftware *Seraline*<sup>®</sup>scan automatisch ausgewertet werden.

## Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (15 µl Probe und 1500 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt. Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2..8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

## Testkomponenten

			Für 20 Bestimmungen	Für 12 x 20 Bestimmungen
1	<b>TESTSTR</b>	<b>Teststreifen inkl. Auswerteschablone</b>	<b>20 Streifen</b> Farbcodierung: hellblau	<b>12 x 20 Streifen</b> Farbcodierung: hellblau
2	<b>WIB CONC 5x</b>	<b>Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach</b>	<b>70 ml</b> Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe	<b>12 x 70 ml</b> Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	<b>CONJ HRP IgG</b>  <b>CONJ HRP IgA</b>	<b>Anti-human IgG-POD-Konjugat</b> oder <b>Anti-human IgA-POD-Konjugat</b>	<b>35 ml</b> gebrauchsfertig, <b>IgG</b> , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe <b>IgA</b> , violett gefärbt, transparente Flasche, violette Kappe	<b>12 x 35 ml</b> gebrauchsfertig <b>IgG</b> , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe <b>IgA</b> , violett gefärbt, transparente Flasche, violette Kappe
4	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>Substrat</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	<b>35 ml</b> gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe	<b>12 x 35 ml</b> gebrauchsfertig schwarze Flasche, blaue Kappe
5	<b>INCUTRAY</b>	<b>Inkubationswanne mit Deckel</b>	<b>2</b>	-

## Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Messzylinder und Bechergläser
- Pipetten und Pipettenspitzen für 15 µl und 1500 µl
- Kunststoffpinzette
- Wipp-Schüttler
- Filterpapier
- Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Inkubationswannen (▽ 12 x 20)

## Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

### Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 oder 12 x 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

### Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

## Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

### Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **1,5 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **1,5 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

### Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

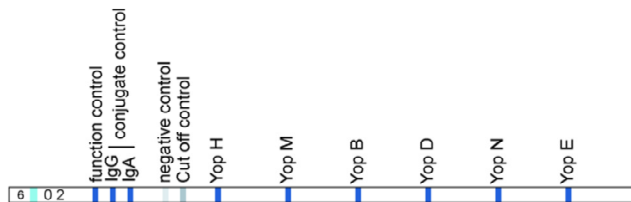
## Auswertung

### Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA sind untereinander 5 Kontrollbänder aufgetragen:

- Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
- Die Konjugatkontrollen IgG und IgA (positive Bande nur mit dem eingesetzten Konjugat IgG oder IgA).  
**Achtung:** Die jeweils andere Konjugatkontrolle kann in Abhängigkeit von der Probe auch eine blassere, unspezifische Bande zeigen.
- Die Intensität der negativ-Kontrolle muss kleiner als die der Cut-off-Kontrolle sein.
- Die Cut-off-Kontrolle (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Banden als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle, die erwartete Konjugatkontrolle und die Cut-off-Kontrolle sichtbar sind.



### Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Teststreifen können mit Hilfe der Evaluierungssoftware *Seraline*<sup>®</sup>scan automatisch ausgewertet werden. Alternativ kann die Zuordnung der Banden mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchgeführt werden. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Bewertung	IgG	IgA
<b>negativ</b>	Farbintensität der Banden < Cut-off-Kontrolle	Farbintensität der Banden < Cut-off-Kontrolle
<b>grenzwertig</b>	Yop D = Cut-off oder 1 Yop Bande $\geq$ Cut-off-Kontrolle <b>(aber nicht Yop D)</b>	1 Yop Bande $\geq$ Cut-off-Kontrolle <b>(aber nicht Yop D)</b>
<b>positiv</b>	Yop D > Cut-off-Kontrolle oder 2 Banden $\geq$ Cut-off-Kontrolle <b>(aber nicht Yop D=Cut-off)</b>	Yop D $\geq$ Cut-off-Kontrolle oder 2 Banden $\geq$ Cut-off-Kontrolle

### Verwendete Yop\* Antigene

Bezeichnung, MW	Spezifität
Yop H, 48 kD	<b>Alle aufgeführten Proteine (Yop) sind hochspezifisch für humanpathogene Yersinien</b>
Yop M, 45 kD	
Yop B, 42 kD	
Yop D, 36 kD	
Yop N, 34 kD	
Yop E, 27 kD	

\* Die Nomenklatur für eine Reihe von Banden wird in der Literatur hinsichtlich Molekulargewicht (MW) nicht einheitlich wiedergegeben (2, 5, 7).

## Leistungsmerkmale

### Sensitivität

Seren von Patienten mit Verdacht auf Yersiniose wurden vergleichend im *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA und einem anderen kommerziellen Line Immunoassay untersucht.

IgG Nachweis (n = 150)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG		
		positiv	grenzwertig	negativ
Vergleichs-Line-Immunoassay	positiv	130	7	3
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	0	2	8

IgA Nachweis (n = 150)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA		
		positiv	grenzwertig	negativ
Vergleichs-Line-Immunoassay	positiv	71	4	7
	grenzwertig	2	1	3
	negativ	5	4	53

Sensitivität IgG: 98.6% Sensitivität IgA: 88.6%

### Spezifität

Blutspenderseren wurden vergleichend im *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA und einem anderen kommerziellen Line Immunoassay untersucht.

IgG Nachweis (n = 100)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG		
		positiv	grenzwertig	negativ
Vergleichs-Line-Immunoassay	positiv	25	3	4
	grenzwertig	0	3	6
	negativ	1	6	52

IgA Nachweis (n = 100)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA		
		positiv	grenzwertig	negativ
Vergleichs-Line-Immunoassay	positiv	9	1	5
	grenzwertig	0	0	2
	negativ	0	6	77

Spezifität IgG: 88.1% Spezifität IgA: 92.8%

### Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

### Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

## Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**



## Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2018-03-15	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung



Hersteller



Bestell-Nummer



Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur















Arbeitsanleitung beachten



## Seraline<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG Seraline<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA

Line Immunoassay for detection of IgG or IgA antibodies to *Yersinia enterocolitica*  
in human serum or plasma

 LIA-005-6 G	 20	 LIA-005-6 G-12	 12x 20	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	
 LIA-005-6 A	 20	 LIA-005-6 A-12	 12x 20	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenthagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · [www.seramun.com](http://www.seramun.com)  
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com)

## Introduction

The genus *Yersinia* comprises gram-negative bacteria belonging to the family Enterobacteriaceae. There are at least three *Yersinia* species which are pathogenic to human: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*. More than 60 serovariants are known from *Y. enterocolitica* (6).

The human pathogenic *Yersinia* species are characterized by a 70 kb plasmid encoding for cytosolic, membraneous and releasing proteins. The main virulence markers are the *Yersinia* outer proteins (Yop) which are released by the bacteria (2, 8). These proteins are highly immunogenic and induce the generation of specific antibodies of the IgA, IgG and IgM isotype (3, 4). IgM and IgA antibody levels decrease within months after infection whereas IgG antibodies may persist for years. In cases of immunopathological complications and chronic forms of *Yersinia* infections IgA antibodies are detectable for a longer period of time (1).

Although no precise data are available the assumed incubation period for *Y. enterocolitica* ranges from 2 to 10 days. The pathogens are transferred through contaminated food (meat and sausages) and less frequently through direct contact. Many mammalian species are known to serve as reservoir hosts, but rodents, domestic and farm animals are of major epidemiological importance (6).

The clinical symptoms of an infection with *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* are very similar. In infants an infection induces a self limiting gastroenteritis frequently accompanied by fever and vomiting. Juveniles often react with a lymphadenitis characterized by abdominal pain often mistaken as appendicitis. Immunopathological complications often occur as reactive arthritis (HLA-B27 associated) and erythema nodosum (8).

## Literature:

1. Cremer, J., Putzker, M., Faulde, M., Zöller, L., Immunoblotting of *Yersinia* plasmid-encoded released proteins: A tool for serodiagnosis, *Electrophoresis* 1993, 14: 952-959
2. Iriarte, M., Cornelis, G.R, Identification of SycN, YscX, and YscY, Three new elements of the *Yersinia* Yop Virulon, *J. Bacteriol.* 1999, 181/2: 675-680
3. Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N., Laufs, R., Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media *Infect. Immun.* 1986, 54/2: 561-567
4. Heesemann, J., Grüter, L., Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells *FEMS Microbiol. Lett.* 1987, 40, 37-41
5. Kendrick, C.J., Baker, B., Morris, A.J., O'Toole, P.W., Identification of *Yersinia*-infected blood donors by anti-Yop IgA immunoassay, *Transfusion*, 2001, 41: 1365-1372
6. Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J., Pulverer, G., *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie* Gustav Fischer Verlag Stuttgart Jena New York, 1994, 7. Auflage
7. Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., Stainier, I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62/4, 1315-1352
8. Paerregaard, Interaction between *Yersinia enterocolitica* and the host with special reference to virulence plasmid encoded adhesion and humoral immunity *Dan. Med. Bull.* 1992, 39/2, 155-172

## Intended use

The *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA is a Line Immunoassay (LIA) for detection of specific IgG or IgA antibodies against Yersinia outer proteins (Yops) of *Yersinia enterocolitica* in human serum or plasma samples.

## Principle of the test

The antigens are plotted on nitrocellulose membranes and blocked to avoid unspecific reactions. After this procedure the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

### Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 101) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

### Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

### Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates. The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*<sup>®</sup>scan software.

## Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 101 (15 µl sample and 1500 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

## Kit components

			for 20 determinations	for 12 x 20 determinations
1	<b>TESTSTR</b>	test strips incl. evaluation template	20 strips colour coded: light blue	12 x 20 strips colour coded: light blue
2	<b>WIB CONC 5x</b>	wash and incubation buffer 5-fold	70 ml concentrate, transparent bottle, black cap	12 x 70 ml concentrate, transparent bottle, black cap
3	<b>CONJ HRP IgG</b>	anti-human IgG-HRP-conjugate	35 ml, ready to use, IgG, coloured red, transparent bottle, red cap	12 x 35 ml, ready to use, IgG, coloured red, transparent bottle, red cap
	<b>CONJ HRP IgA</b>	anti-human IgA-HRP-conjugate	IgA, coloured purple, transparent bottle, purple cap	IgA, coloured purple, transparent bottle, purple cap
4	<b>SUBSTR TMB</b>	substrate 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	35 ml, ready to use, black bottle, blue cap	12 x 35 ml, ready to use, black bottle, blue cap
5	<b>INCUTRAY</b>	incubation tray with cover	2	-

## Materials required but not provided

- glassware
- pipettes and tips for 15 µl and 1500 µl
- plastic forceps
- rocking platform (vertical)
- filter paper
- collecting devices for infectious material
- distilled or deionized water
- incubation trays (▽ 12 x 20)

## Preparation and storage of reagents

### Kit size and expiry

One kit is designed for 20 or 12 x 20 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

### Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

## Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

### Working steps

1. Incubate the test strips with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **15 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **1.5 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **1.5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **1.5 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

### Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

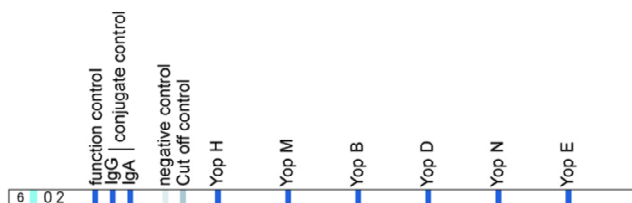
## Test evaluation

### Test validity

The *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA test strips contain 5 consecutive control lines under the strip number:

- Function control (positive reaction with every sample).
- Conjugate controls IgG and IgA (positive reaction with the corresponding conjugate).  
**Note:** The other conjugate control band may develop a weak, non-specific colour.
- The intensity of the negative control must be less than the Cut off control.
- Cut off control (band intensity is used for result evaluation of the diagnostic bands).

The test run is valid if the function control, the corresponding conjugate control and the Cut off control are clearly visible.



### Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips. To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*<sup>®</sup> scan software. Judgement of the bands is performed according to the following classification:

Result interpretation	IgG	IgA
<b>negative</b>	all bands < Cut off control	all bands < cut off-control
<b>borderline</b>	Yop D = Cut off control or 1 Yop band $\geq$ Cut off control <b>(but NOT Yop D)</b>	1 Yop band $\geq$ Cut off control <b>(but NOT Yop D)</b>
<b>positive</b>	Yop D > Cut-off control or 2 bands $\geq$ Cut off control <b>(but NOT Yop D=Cut-off)</b>	Yop D $\geq$ Cut off control or 2 bands $\geq$ Cut off control

### Used Yop antigens

Nomenclature*, MW	Specificity
Yop H, 48 kD	<b>all listed proteins (Yops) are highly specific for human pathogenic Yersiniae</b>
Yop M, 45 kD	
Yop B, 42 kD	
Yop D, 36 kD	
Yop N, 34 kD	
Yop E, 27 kD	

\* The nomenclature for some bands is not consistently used in the literature concerning molecular weight (MW) and specificity, respectively (2, 5, 7).

## Performance characteristics

### Sensitivity

Results from the comparative investigation of serum samples from patients suspected of Yersiniosis using *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA and another commercial assay.

Detection of IgG (n = 150)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG		
		positive	borderline	negative
Commercial-Line-Immunoassay	positive	130	7	3
	borderline	0	0	0
	negative	0	2	8

Detection of IgA (n = 150)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA		
		positive	borderline	negative
Commercial-Line-Immunoassay	positive	71	4	7
	borderline	2	1	3
	negative	5	4	53

Sensitivity IgG: 98.6%    Sensitivity IgA: 88.6%

### Specificity

Results from the comparative investigation of randomly collected blood donor samples using *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG / *Seraline*<sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA and another commercial assay.

Detection of IgG (n = 100)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgG		
		positive	borderline	negative
Commercial-Line-Immunoassay	positiv	25	3	4
	grenzwertig	0	3	6
	negativ	1	6	52

Detection of IgA (n = 100)		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> Anti-Yersinia-6 IgA		
		positive	borderline	negative
Commercial-Line-Immunoassay	positive	9	1	5
	borderline	0	0	2
	negative	0	6	77

Specificity IgG: 88.1%    Specificity IgA: 92.8%

### Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. As in other Immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

### Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

## Common advices and precautions

**This kit is for *in-vitro* use only.** Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only.

Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

**Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate.**

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8°C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



## History of changes

Version	Section	Modifications
2018-03-15	Common advices and precautions	Update



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use