

recomLine Yersinia IgG

recomLine Yersinia IgA [IgM]

Immunoassay mit rekombinanten Antigenen zur Bestimmung von IgG, IgA- und IgM-Antikörpern gegen **Yersinia enterocolitica** und **Yersinia pseudotuberculosis** in humanem Serum oder Plasma

1. Allgemeines/ Verwendungszweck

Der *recomLine Yersinia* ist ein qualitativer *in-vitro* Test zum Nachweis von Serum-Antikörpern gegen plasmid-kodierte Virulenz-Marker von *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*. Diese, auf der Zelloberfläche lokalisierten Virulenzfaktoren werden nur von pathogenen *Yersinia*-Stämmen gebildet. Die entsprechenden Gene sind auf einem ca. 70 Kb großen Plasmid in einem Virulenz-Operon ("Virulon") kodiert. Unter bestimmten Bedingungen können diese Antigene in das Kulturmedium abgegeben werden, weswegen sie auch als YOPs (*Yersinia* outer membrane proteins) oder „released proteins“ bezeichnet werden. Das Testprinzip erlaubt durch das separate Auflinieren der Antigene im Unterschied zu ELISAs die sichere Identifizierung von spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen YOPs.

2. *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*

Die humanpathogenen Erreger *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* sind gramnegative Stäbchenbakterien aus dem Genus *Yersinia* der Familie der Enterobacteriaceae, die weltweit in gemäßigten und subtropischen Regionen vorkommen. Latent infizierte Warmblüter stellen das Reservoir dar, die Übertragung erfolgt oral durch kontaminiertes Wasser oder Nahrungsmittel.

Die klinischen Symptome nach *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*-Infektionen weisen Ähnlichkeiten auf. Es werden eine enteritische, eine „pseudoappendizitische“ und eine septikämische Verlaufsform unterschieden. Typische Symptome einer akuten Infektion durch *Yersinia enterocolitica* sind Diarrhoe, Bauchschmerzen und Fieber. Während bei Kindern der Durchfall im Vordergrund steht, ist es bei älteren Patienten der Bauchschmerz, der eine akute Appendizitis vortäuschen kann.

Als Komplikationen können akute reaktive Arthritiden, Erythema nodosum, akute Glomerulonephritis und Myocarditis auftreten. Für die Manifestation der akuten reaktiven Arthritis nach *Yersinia*-Infektion ist der genetische Marker HLA-B27 von Bedeutung. Etwa 70% der Patienten mit *Yersinia*-Arthritis haben das Merkmal HLA-B27.

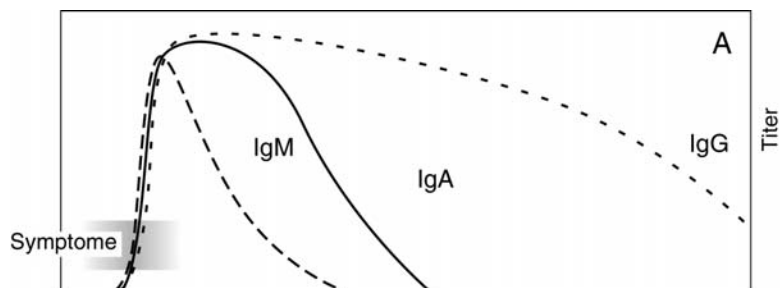
3. Diagnostik

Ursprünglich galt der Nachweis agglutinierender Antikörper gegenüber den H- und O-Antigenen von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Widal) als gängiges Verfahren der Yersinien-Serodiagnostik. Aufgrund von O-Antigenen ist eine serologische Differenzierung in ca. 60 *Y. enterocolitica*- und 7 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme möglich (O-Serovare). Für *Y. enterocolitica*-Erkrankungen des Menschen sind in der Regel die Serovare 3 und 9 verantwortlich. Mit der Beschreibung des Virulenz Operons (s. Allgemeines/ Verwendungszweck) hat diese Differenzierung an Bedeutung verloren - über den Nachweis von YOP-spezifischen Antikörpern werden immer alle pathogenen Yersinien-Stämme erfasst. Darüber hinaus hat die Widal Agglutinationsreaktion Spezifitätsprobleme (Kreuzreaktionen mit *Brucella abortus*, Rickettsien, Morganellen, Salmonellen und anderen Enterobacteriaceae). Ebenfalls fällt der Agglutinationstiter verhältnismäßig schnell ab und ist in der Regel während der späten und chronischen Phase nicht mehr signifikant erhöht (Abb. 1C, Tabelle 4). Dies bedeutet, dass bei schweren *Yersinia*-Infektionen und bei der *Yersinia*-induzierten reaktiven Arthritis nicht selten falsch-negative Widal-Titer erhalten werden; bekanntermaßen können über die Widal-Reaktion keine IgA-Antikörper nachgewiesen werden.

Abb. 1:

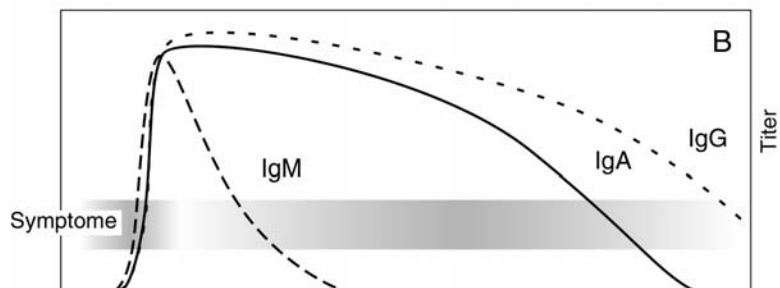
A) Titerverläufe yersinien-spezifischer Antikörper bei akuten und unkomplizierten Yersiniosen:

Enteritis, Pseudoappendizitis, Yersinia-Kolitis, Yersinia-Septikämie, Lymphadenopathie.

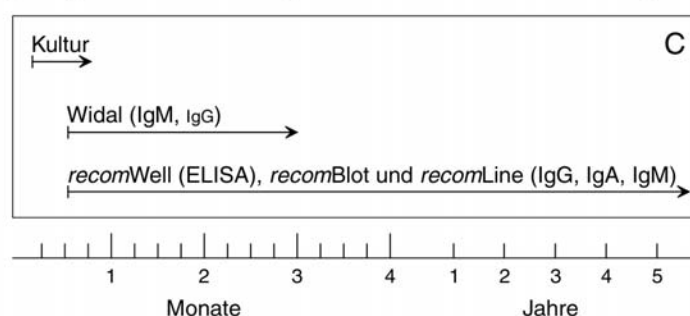


B) Titerverläufe yersinien-spezifischer Antikörper bei immunpathologischen Komplikationen und chronischen Yersiniosen:

Reaktive Arthritis, Erythema nodosum, Ileitis "Pseudo Crohn", Lymphadenopathie, Glomerulonephritis, Myokarditis.



C) Nachweismethoden und ihre zeitlichen Grenzen im Infektionsverlauf.



Demgegenüber bieten ELISA und *recomLine*, insbesondere auf der Basis rekombinanter Antigene, deutliche Vorteile und haben sich folglich als Standard-Screening- bzw. Bestätigungstest etabliert. Die Tests *recomWell* Yersinia (ELISA) und *recomLine* Yersinia unterscheiden sich von der Widal Agglutinationsreaktion in mehreren wichtigen Eigenschaften:

- **Es werden alle Serovare von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* erfasst.**
- **Kreuzreaktivitäten zu Brucellen und anderen Erregern bestehen nicht.**
- **Nur virulente Yersinia-Stämme bilden „released proteins“ (YOPs), so dass der Antikörpernachweis unmittelbar einen Rückschluss auf die Virulenz des Infektionserregers zulässt.**
- **Die IgG-, IgA- und IgM-Immunantworten werden getrennt erfasst und können jeweils in ihrer Intensität bewertet werden.**

Gegenüber dem herkömmlichen Immunoblot mit aufgetrennten Lysat-Antigenen zeichnet sich der *recomLine* Yersinia aus durch:

- **Klar definierte, rekombinante, hoch aufgereinigte Antigene, wodurch eine eindeutig höhere Spezifität erreicht wird. Die Interpretation der Ergebnisse ist deutlich einfacher.**
- **Höhere Sensitivität aufgrund mengenmäßig optimierter Antigene.**
- **Kontrollbanden zur Überprüfung der Konjugat-Reaktion (IgG, IgA, IgM).**
- **Kontrollbande als eine für jeden einzelnen Teststreifen interne Cutoff Kontrolle.**

Im *recomLine* Yersinia werden folgende Antigene nach absteigender Proteingröße aufliert: YOP M (58kDa), YOP H (46kDa), V-AG (38kDa), YOP D (35kDa), YOP N (34kDa) und YOP E (25kDa), wobei YOP D für die Diagnostik von entscheidender Bedeutung ist. Die IgG-Titer persistieren über Jahre; nach Literaturangaben sind bei ca. 30-40% der Bevölkerung Yersinia-IgG-Antikörper als Durchseuchungstiter nachweisbar. Nach einer Yersinia-Infektion bilden sich - neben einem IgG-Titer - auch YOP-spezifische

IgA- und IgM-Antikörper, die bei normalem Verlauf innerhalb von einigen Monaten wieder verschwinden oder zumindest in ihrem Titer sehr schwach werden (Abb. 1A). Bei einem Verlauf der Infektion mit nachfolgenden Komplikationen (reaktive Arthritis, Erythema nodosum, etc.) bleibt jedoch ein hoher IgA-Titer, zum Teil über Jahre hin, bestehen, während der IgM-Titer innerhalb weniger Monate stark absinkt. Diese charakteristischen IgA-Antikörpertiter können mit dem *recomLine* erfasst werden und sind deswegen ein hilfreiches Indiz bei der Abklärung von reaktiven Arthritiden und weiteren Symptomen (Abb. 1B).

4. Testprinzip

Die rekombinanten, hochgereinigten Proteine werden auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Diese Matrix wird anschließend in Streifen geschnitten.

Zum Nachweis von Yersinia-spezifischen Antikörpern werden die Streifen mit der verdünnten Serumprobe inkubiert, wobei die Antikörper sich an die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend gewaschen und die Streifen in einem zweiten Schritt mit anti-human-IgG, -IgM bzw. -IgA inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat, erscheint an der entsprechenden Stelle eine dunkle Bande auf dem Streifen.

Am oberen Ende der Teststreifen befinden sich untereinander fünf Kontrollbanden:

1. Die Reaktionskontrolle unter der Streifennummer, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muss.
2. Drei Konjugatkontrollen IgG/IgM/IgA: diese Banden dienen zur Kontrolle der jeweiligen nachgewiesenen Antikörperklasse. Wird der Teststreifen z. B. zum Nachweis von IgG-Antikörpern benutzt, zeigt die Konjugatkontrollbande IgG eine deutliche Bande. Analoges gilt für die Konjugatkontrollbanden IgM bzw. IgA.
3. "Cutoff Kontrolle": zur Kontrolle des Färbeprozesses bzw. Auswertung der Teststreifen. Die Intensität dieser Bande erlaubt die Beurteilung der Antikörper-Reaktivität in positiv, fraglich oder negativ.

5. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 50 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF 10 X	100 ml	Waschpuffer (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: Methylisothiazolon und Oxypyron
SUBS TMB	2x45 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
MILKPOW	5 g	Magermilchpulver
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	2	Auswertebogen

5.1 *recomLine* Yersinia IgG

Jeder Reagenziensatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

TESTSTR	2 Stück	Röhrchen mit 25 durchnummerierten Teststreifen, beschichtet mit rekombinant hergestellten Yersinia Antigenen
CONJ IgG	12 ml	Anti-human IgG Konjugat (zehnfach konzentriert) Aus Kaninchen, enthält NaN ₃

5.2 recomLine Yersinia IgA [IgM]

Jeder Reagenziensatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

TESTSTR	2 Stück	Röhrchen mit 25 durchnummerierten Teststreifen, beschichtet mit rekombinant hergestellten Yersinia Antigenen
CONJ IgA	12 ml	Anti-human IgA Konjugat (zehnfach konzentriert) Aus Kaninchen, enthält NaN ₃

IgM-Bestimmung

Zum Nachweis von IgM-Antikörpern kann zusätzlich zum recomLine Yersinia IgA bestellt werden:

CONJ IgM	12 ml	Anti-human IgM Konjugat (zehnfach konzentriert)
Art. Nr. 10075		Aus Kaninchen, enthält NaN ₃

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser, Absaugsystem mit Desinfektionsfalle, Mikropipetten, Plastikpinzette, Schüttler, Messzylinder, Laborwaage.

Inkubationsschalen (sind bei Bedarf von der MIKROGEN GmbH zu beziehen),

7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

7.1 Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate enthalten Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens 1 Stunde bei 121°C autoklaviert werden.
- ☞ Inkubationsschalen nur einmal verwenden.
- ☞ Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette handhaben.

7.2 Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern, **nicht einfrieren**. Vor Testbeginn sind alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf 18°C - 25°C (Raumtemperatur) zu temperieren. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Inkubationstemperatur soll zwischen 18°C und 25°C liegen.

Vor Gebrauch die konzentrierten Konjugate gut durchmischen. Die Patientenserum ebenfalls gut mischen.

Das Röhrchen mit den Teststreifen ist erst unmittelbar vor Gebrauch zu öffnen, um eine Kondenswasserbildung zu vermeiden. Die nicht benötigten Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei 2°C - 8°C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Es dürfen nur Einzelreagenzien verwendet werden, deren Chargennummer mit der entsprechenden Chargennummer auf dem Etikett der Kitverpackung übereinstimmt.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Bei substantiellen Änderungen am Produkt, bzw. der Anwendungsvorschrift kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

7.3 Herstellung der Lösungen

7.3.1 Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers

Dieser Puffer wird für die Serum- und Konjugatverdünnung sowie die Waschschritte benötigt.

Vor dem Verdünnen ist das Volumen des Waschpuffers für die entsprechende Anzahl der durchzuführenden Tests zu bestimmen.

Das Magermilchpulver wird zuerst in Waschpuffer-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung: 1 + 9). Die benötigten Mengen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden.

Tabelle 1: Waschpuffer pro eingesetzte Teststreifen

eingesetzte Teststreifen	Magermilch Pulver	Waschpuffer-Konzentrat	Deionisiertes Wasser	gebrauchsfertiger Waschpuffer
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5 g	50 ml	450 ml	500 ml

7.3.2 Herstellung der Konjugatlösungen

Die Konjugatlösung für die IgG-, IgM bzw. IgA-Bestimmung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Ein Teil des IgG-, IgM- bzw. IgA-Konjugat-Konzentrats wird mit 9 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer verdünnt (1 + 9).

Die benötigten Mengen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Tabelle 2: Volumina der Anti-human-IgG / IgM / IgA-Konjugat-Verdünnung

eingesetzte Teststreifen*	Konjugat-Konzentrat (wahlweise IgG, IgM, IgA)	gebrauchsfertiger Waschpuffer	Gebrauchsfertige Konjugatlösung
1	0,2	1,8 ml	2 ml
2	0,4 ml	3,6 ml	4 ml
3	0,6 ml	5,4 ml	6 ml
5	1 ml	9 ml	10 ml
10	2 ml	18 ml	20 ml
20	4 ml	36 ml	40 ml
25	5 ml	45 ml	50 ml

* Die Mengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. an einem Gerät) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1 bis 3 Streifen ansetzen.

7.3.3 Substratlösung

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur (18°C - 25°C) bringen.

Eine Kontamination der nicht verwendeten Substratlösung durch unsterile Pipettenspitzen etc. muss unbedingt vermieden werden, da dadurch die Sensitivität des Testes beeinträchtigt werden kann.

7.4 Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden.

Die Konjugatlösung muss immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde, um eine Hämolyse zu vermeiden. Hitzeinaktivierte Proben können zu erhöhten Hintergrundreaktionen führen. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen.

Die Verwendung von lipämischen, hämolysierten oder trüben Proben kann einen dunklen Hintergrund im recomLine Yersinia IgG/IgM/IgA ergeben. Diese Proben können darüber hinaus zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei 2°C - 8°C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20°C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen.

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die unter 9.3 und 9.5 beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

9.2 Inkubation der Proben

1. Für jeden Testansatz wird eine Vertiefung einer Inkubationsschale benötigt (siehe 6). In die Vertiefungen werden je **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers pipettiert. In die mit gebrauchsfertigem Waschpuffer gefüllten Vertiefungen wird anschließend je ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht. Die Streifenummerierung zeigt nach oben.

Achtung!

Die Streifen müssen vollständig mit Waschpuffer benetzt und untergetaucht sein.

Verwendete Röhrchennummer und Streifenummer im Auswertebogen notieren.

2. Probenzugabe

IgG/IgM/IgA-Testdurchführung: **20 µl** einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) werden je Inkubationsansatz zum Teststreifen pipettiert. (Verdünnung 1 + 100)

Bitte achten Sie darauf, die Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Waschpuffer einzupipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationswanne einzumischen.

Probennummern und zu detektierende Immunglobulinklasse (IgG, IgM, IgA) im Auswertebogen notieren.

Die Inkubationsschale wird mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt und unter leichtem Schütteln **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert.

Achtung!

Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden; insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden.

9.3 Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abgenommen.
2. Die Serumverdünnung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt.

Achtung!

Nach dem Absaugen der Lösungen aus einer Vertiefung sind die Pipettenspitzen zu wechseln oder nach jedem Absaugvorgang gut mit deionisiertem Wasser zu spülen, da die Gefahr einer Kreuzkontamination besteht.

Bei maschineller Abarbeitung sind diesbezüglich die Hinweise des Geräteherstellers zu beachten.

3. In jede Vertiefung werden anschließend **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers gegeben und für **5 Minuten** unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Waschpuffer abgesaugt.
4. Der Waschschrift unter Punkt 3 wird insgesamt **dreimal** durchgeführt.

9.4 Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Vertiefung **2 ml** der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung (siehe Tabelle 2) gegeben und **45 Minuten** unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

9.5 Waschen

Die Konjugatlösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut gewaschen (vergleiche 0).

9.6 Substratreaktion

1. In jede Vertiefung werden **1,5 ml Substratlösung** gegeben und **5 – 10 Minuten** unter leichtem Schütteln und unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Sobald die Cutoff-Kontrollbande zu sehen ist, wird der Färbeprozess beendet.

9.7 Abstoppen der Reaktion

1. Nach Absaugen der Substratlösung werden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen.
2. Die Streifen werden vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser entnommen und zum Trocknen für ca. 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers gelegt. Anschließend können die Streifen auf dem beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und die Ergebnisse protokolliert werden.
3. Die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

10. Zusammenfassung der Testdurchführung

1.	alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
2.	in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer die Streifen einlegen, die Streifen müssen komplett untergetaucht sein.
3.	jeweils 20 µl von der Probe einpipettieren
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
5.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer, auf dem Schüttler waschen
6.	2 ml gebrauchsfertige Konjugatlösung zugeben
7.	45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
8.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer, auf dem Schüttler waschen
9.	1,5 ml der Substratlösung zugeben; 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren.
10.	mindestens dreimal mit deionisiertem Wasser waschen
11.	2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers trocknen und das Ergebnis ablesen

11. Auswertung

11.1 Bewertung der Bandenintensität

- Notieren Sie im beigefügten Auswertebogen Datum und Chargen-Nummer, sowie die detektierte Antikörperklasse.
- Tragen Sie die Proben-Identifizierungs-Nummern in das Protokollblatt ein.
- Kleben Sie nun mit einem Klebestift die dazugehörigen Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens. Richten Sie dazu die Teststreifen mit der Reaktions-Kontrollbande an der eingezeichneten Markierungslinie aus. Kleben Sie dann mit einem durchsichtigen Klebeband die Teststreifen links von der Markierungslinie an. Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen.
- Identifizieren Sie nun die Banden der entwickelten Teststreifen anhand des aufgedruckten Kontrollstreifens des Auswertebogens und tragen diese in das Protokollblatt ein. Nehmen Sie dazu anhand der Tabelle 3 die Bewertung der Intensität der auftretenden Banden gesondert für die entsprechenden Immunglobulin-Klassen vor.

11.2 Kontrollergebnisse

Eine Auswertung des Tests kann erfolgen, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Reaktionskontroll-Bande (oberste Linie) deutlich gefärbt, dunkle Bande
- Antikörperklasse (zweite bis vierte Bande): die entsprechende Konjugatkontrollbande muss eine deutliche Färbung zeigen. Die beiden anderen Konjugatkontrollbanden können eine schwache, unspezifische Färbung entwickeln.
- Cutoff-Kontrolle (fünfte Bande): schwache, aber sichtbare Färbung

Tabelle 3: Bewertung der Bandenintensität im Bezug zur Cutoff-Bande

Banden	Intensität
keine Reaktion	-
sehr schwache Intensität (geringer als Cutoff-Bande)	+/-
schwache Intensität (entspricht Cutoff Bande)	+
starke Intensität (stärker als Cutoff-Bande)	++
sehr starke Intensität	+++

Achtung !

Die Bandenmuster beim *recomLine* Yersinia IgG- und IgM- und IgA-Nachweis können unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Es ist möglich, dass der *recomLine* IgG kräftigere und dunklere Banden als der *recomLine* IgM bzw. *recomLine* IgA zeigt. Die Intensität der Proteinbanden ist abhängig von der Konzentration der Yersinien -spezifischen Antikörper.

11.3 Testergebnisse und Testinterpretation

Für die Beurteilung des Yersinia-Immunistatus sollten immer die Ergebnisse des IgG- und IgA-Nachweises zusammen betrachtet werden.

Für alle drei Antikörperklassen, IgG, IgA und IgM gelten die selben Interpretationskriterien:

<ul style="list-style-type: none"> keine Banden (-) oder Banden mit schwächerer (+/-) Intensität im Vergleich zur Cutoff-Bande. oder eine isolierte Bande (außer YOP D-Bande mit gleicher (+) oder stärkerer (++) Intensität im Vergleich zur Cutoff-Bande. 	negativ
<ul style="list-style-type: none"> fehlende YOP D-Bande (-), aber mindestens zwei der anderen Banden, mit gleicher (+) oder stärkerer (++) Intensität im Vergleich zur Cutoff-Bande. oder schwache YOP D-Bande (+/-) mit mindestens zwei der anderen Banden mit gleicher (+) oder stärkerer (++) Intensität im Vergleich zur Cutoff-Bande. 	fraglich
<ul style="list-style-type: none"> Die YOP D-Bande mit gleicher (+) oder stärkerer (++) Intensität im Vergleich zur Cutoff-Bande, unabhängig von der Reaktivität der anderen Banden. 	positiv

11.4 Hinweise zur Interpretation

Nach Frischinfektionen verschwinden IgM- und IgA-Antikörper innerhalb von drei bis sechs Monaten. Die IgG-Antikörper persistieren über Jahre. Bei chronischen Yersiniosen und immunpathologischen Komplikationen können - neben hohen IgG-Reaktivitäten - IgA-Titer über Jahre hin gefunden werden. Wichtig ist, dass für die Beurteilung einer IgA-Reaktivität das Ergebnis der IgG- und evtl. auch IgM-Nachweise mit in die Beurteilung einbezogen werden.

Proben mit fraglichen Ergebnissen sollten in Abhängigkeit von der klinischen Situation nach 3 - 5 Wochen kontrolliert werden.

Isoliert positive IgA-Nachweise bedürfen sorgfältiger Interpretation. Hier kann es sich um eine frische Infektion oder langfristig persistierende Antikörper handeln.

Für alle Testinterpretationen, besonders aber bei schwachpositiven Resultaten, ist die Einbeziehung klinischer Informationen unerlässlich. Es empfiehlt sich auch hier eine enge Kooperation von Labor und behandelndem Arzt.

IgG-Titer persistieren über Jahre; nach Literaturangaben sind bei ca. 30 - 40 % der Gesamtbevölkerung Yersinia IgG-Antikörper als Durchseuchungstiter nachweisbar. Für Yersinia IgA-Antikörper wird ein Durchseuchungstiter von ca. 11 % angegeben. Bei der Untersuchung von 2000 Patientenseren in einem klinischen Labor wurde ein Anteil von ca. 50% IgG-positiver und ca. 25% IgA-positiver Patienten

ermittelt. Das entsprechende serologische Bild stellt sich typischerweise folgendermaßen dar: IgG-Antikörper gegen das 35 kDa YOP D und möglicherweise weitere Antigene, keine oder schwache IgA-Antikörperreaktion sowie fehlende IgM-Antikörperantwort.

Das typische serologische Bild einer Yersinien induzierten reaktiven Arthritis ist ein hoher IgG- und IgA-Titer bei einer schwachen oder fehlenden IgM-Antikörper Reaktivität.

Dunkle Teststreifen: Manche Seren von Patienten können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z.B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergien). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patientenserum verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z.B. "inverse" Banden (weiße Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu werten. Das entsprechende Serum sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

12. Klinische Ergebnisse

Tabelle 4: Vergleich des Widal Agglutinationstests mit dem *recomWell* Yersinia und *recomLine* Yersinia. Angabe der Widal-Resultate in Titerstufen. Angabe der *recomWell*-Resultate in Units. Graue Felder = positive Resultate und weiße Felder = negative Resultate.

Serum	Widal			<i>recomWell</i> Yersinia			<i>recomLine</i> Yersinia		
	Serotyp			IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
	<i>Y. ent.</i>	<i>Y. pseud.</i>	Typ1						
1	1:1600	<1:100	<1:100	215	171	296	positiv	positiv	positiv
2	1:800	<1:100	<1:100	118	112	296	positiv	positiv	positiv
3	1:200	<1:100	<1:100	215	171	296	positiv	positiv	positiv
4	1:800	<1:100	<1:100	215	171	296	positiv	positiv	positiv
5	1:400	<1:100	<1:100	215	171	155	positiv	positiv	positiv
6	<1:100	1:100	<1:100	215	64	68	positiv	positiv	positiv
7	<1:100	<1:100	<1:100	218	55	12	positiv	positiv	negativ
8	<1:100	<1:100	<1:100	218	117	16	positiv	positiv	negativ
9	<1:100	<1:100	<1:100	198	110	10	positiv	positiv	negativ
10	<1:100	<1:100	<1:100	147	150	10	positiv	positiv	negativ
11	<1:100	<1:100	<1:100	218	74	13	positiv	positiv	negativ
12	<1:100	<1:100	<1:100	218	47	11	positiv	positiv	negativ
13	<1:100	<1:100	<1:100	218	50	11	positiv	positiv	negativ
14	<1:100	<1:100	<1:100	254	74	10	positiv	positiv	negativ
15	<1:100	<1:100	<1:100	33	8	11	positiv	negativ	negativ
16	<1:100	<1:100	<1:100	94	7	11	positiv	negativ	negativ
17	<1:100	1:200	<1:100	85	13	19	positiv	negativ	negativ
18	<1:100	<1:100	<1:100	51	6	13	positiv	negativ	negativ
19	<1:100	<1:100	<1:100	6	4	8	negativ	negativ	negativ
20	<1:100	<1:100	<1:100	6	7	12	negativ	negativ	negativ

Tabelle 5: Blutspender-Seren im *recomLine* Yersinia (n = 100).

	IgG	IgA*	IgM*
positiv	26	9	0
fraglich	0	0	0
negativ	74	91	100

* Die Blutspender-Seren zeigten im IgA-Nachweis überwiegend schwache Reaktivitäten.

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 3. Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur Yersinien-Diagnostik zu.

14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 3.

recomLine Yersinia IgG

recomLine Yersinia IgA [IgM]

Immuno-line assay based on recombinant antigens for the determination of IgG, IgA or IgM antibodies against *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in human serum and plasma

1. General aspects

The recomLine Yersinia is a qualitative *in-vitro* test for the detection of antibodies against plasmid coded virulence markers of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in serum. These virulence markers are localised on the cell surface and formed only by pathogen *Yersinia* strains. The corresponding genes are coded on a 70 Kb plasmid in one virulence operon („virulon“). Under special conditions those plasmid associated proteins are released to the surrounding medium; therefore they are also called „YOPs“ (Yersinia outer membrane proteins). Because of the separately lined antigens the test allows in opposite to the ELISA an undoubtful identification of the specific antibodies against single YOPs.

2. Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis

The genus *Yersinia* are gram-negative rods of which the species *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* are known to be human enteropathogens. They occur world-wide in moderate and subtropical regions. Latently infected warm-blooded animals represent the reservoir; transmission occurs orally by contaminated water or food.

The clinical symptoms after infection with *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* show similarities. A distinction is made between enteritic, „pseudoappendicitic“, and septicaemic disease forms. Typical symptoms of an acute *Yersinia enterocolitica* infection are diarrhoea, stomach ache, and fever. While diarrhoea is the main symptom in children, older patients suffer from stomach ache which can be taken for acute appendicitis.

Complications such as acute reactive arthritis, erythema nodosum, acute glomerulonephritis, and myocarditis can occur. The genetic marker HLA-B27 is of importance for the manifestation of acute reactive arthritis after Yersinia infection. About 70 % of patients with Yersinia arthritis have the marker HLA-B27.

3. Diagnosis

Originally the detection of agglutinating antibodies directed against the H and O antigens of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* (Widal) was accepted as common procedure in *Yersinia* serodiagnosis. On the basis of O antigens a serological differentiation of *Yersinia* in approx. 60 *Y. enterocolitica* and 7 *Y. pseudotuberculosis* strains is possible (O serovars). Serovars 3 and 9 are typically responsible for diseases caused by *Y. enterocolitica* in man. With the discovery of the pathogenicity island (see General aspects) this differentiation has lost its importance - all infections by pathogenic *Yersinia* strains are detected by the identification of YOP specific antibodies. Furthermore the Widal agglutination reaction has specificity problems (cross reactions with *Brucella abortus*, *Rickettsia*, *Morganella*, *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*). The agglutination titer also decreases relative soon and is not significantly increased during late and chronic phase of disease as a rule (Fig. 1C, Tabelle 4). This means, that in the case of hard *Yersinia* infections and *Yersinia* induced reactive arthritis false negative results are not seldom.

Fig. 1:

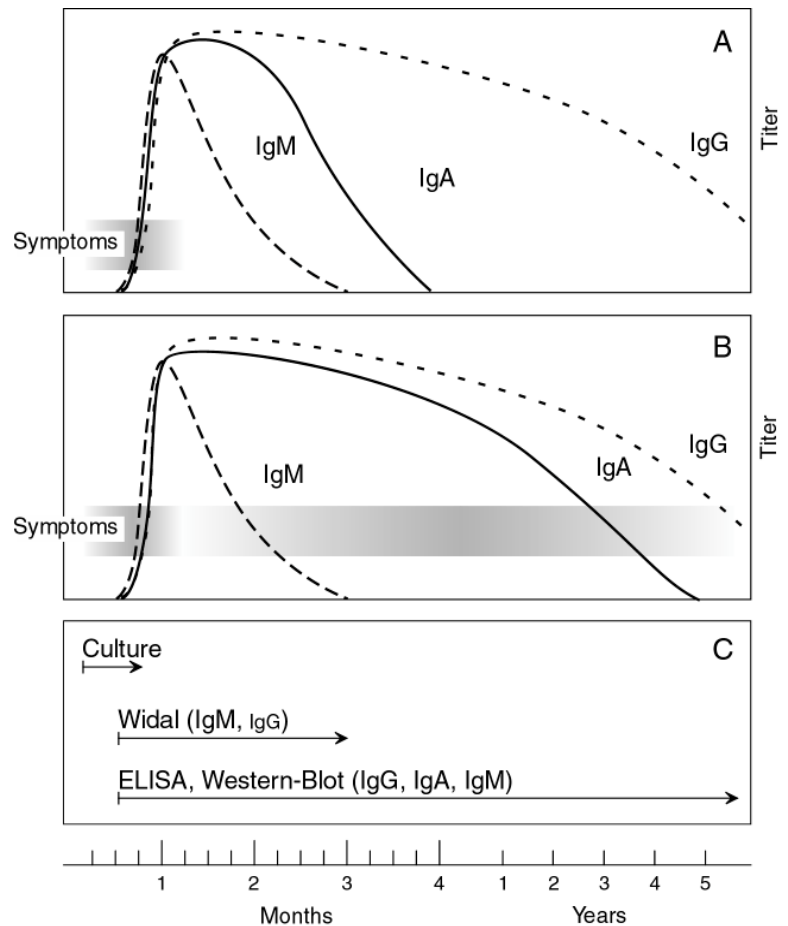
A) Titer courses of yersinia specific antibodies in the case of acute and uncomplicated yersiniosis:

Enteritis, pseudoappendicitis, Yersinia colitis, Yersinia sepsis, lympho adenopathy.

B) Titer courses of yersinia specific antibodies in the case of immuno pathological complications and chronic Yersiniosis:

Reactive arthritis, erythema nodosum, ileitis, lympho adenopathy, glomerulonephritis, myocarditis.

C) Detection methods and their limitations in the course of infection



In comparison, the ELISA and line assay, especially on the basis of recombinant antigens, display clear advantages and have therefore become established as standard screening and confirmation test respectively. The tests *recomWell Yersinia* (ELISA) and *recomLine Yersinia*, differ from the Widal agglutination reaction in several important characteristics:

- **All serovars of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* are detected.**
- **No cross reactions with *Brucella* and other pathogens.**
- **Only the virulent *Yersinia* strains produce „released proteins“ (YOPs). The detection of antibodies gives an immediate picture on the virulence of the pathogen.**
- **IgG, IgA and IgM reactivities are detected separately and can be assessed in their intensity.**

In contrast to common western blots based on lysate antigens the *recomLine Yersinia* is superior because of:

- **Clearly defined, recombinant and highly purified antigens. This leads to increased specificity and simplified interpretation of the results.**
- **Increased sensitivity because of optimum amounts of antigens.**
- **Control band for checking the conjugate reaction (IgG, IgA, IgM)**
- **Further control band which serves as a cutoff control on every test strip**

The following antigens are used in *recomLine Yersinia*: YOP M (58 kDa), YOP H (46 kDa), V-AG (38 kDa), YOP D (33 kDa) and YOP E (25 kDa), whereas YOP D is essential for diagnosis. IgG titers persist over years; according to the literature approx. 30-40% of the population display Yersinia IgG antibodies. Normally YOP specific IgA and IgM titers decrease within months (Fig. 1A). In the case of an infection with subsequent complications (reactive arthritis, erythema nodosum, etc.) on the other hand, high IgA titers can persist over years, whereas IgM titers drop within months. These characteristic IgA antibody titers can be detected with the *recomLine Yersinia* and consequently provide helpful evidence for the clarification of reactive arthritis and other symptoms (Fig. 1B).

4. Test principle

The recombinant, highly purified proteins are applied to a nitrocellulose membrane. This matrix is then cut into strips.

To facilitate detection of Yersinia-specific antibodies, the strips are incubated with the diluted serum sample, whereby the antibodies bind to the antigens on the strips. Unbound antibodies are then flushed away and the strips are incubated in a second step with anti-human IgG, IgM, IgA coupled with horse radish peroxidase. Specifically bound antibodies are detected by means of a colour reaction catalysed by the peroxidase. If an antigen-antibody reaction has taken place, a dark band appears at the corresponding locus on the strip.

Five control bands are arranged side-by-side at the upper end of the test strip:

1. The reaction control band next to the strip number, which must show a reaction to every serum.
2. Three conjugate control bands: IgG/IgM/IgA. These bands serve as controls for the respective antibody class. For instance, if the test strip is used to detect IgG antibodies, the conjugate control band IgG shows a clearly defined band. This applies analogously to the conjugate bands IgM and IgA.
3. "Cutoff control": For control of the coloration and evaluation of the test strip. The intensity of this band provides a basis for evaluation of the antibody reactivity as positive, equivocal or negative.

5. Package contents

The reagents in a pack are sufficient for 50 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF 10 X	100 ml	Wash buffer (ten times the concentration) Contains phosphate buffer, NaCl, KCl, detergent, preservatives: methylisothiazolone and oxyprione
SUBS TMB	45 ml	Substrate solution Tetramethylbenzidin (TMB, ready-to-use)
MILKPOW	5 g	Skim milk powder
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	2	Evaluation form

5.1 recomLine Yersinia IgG

Additionally to the components listed under point 5 each reagent set contains:

TESTSTR	2 pieces	Tubes with 25 consecutively numbered nitrocellulose strips coated with recombinant Yersinia antigens
CONJ IgG	12 ml	Anti-human IgG conjugate (ten times the concentration) From rabbit, contains NaN ₃

5.2 recomLine Yersinia IgA [IgM]

Additionally to the components listed under point 5 each reagent set contains:

TESTSTR	2 Pieces	Tubes with 25 consecutively numbered nitrocellulose strips coated with recombinant Yersinia antigens
CONJ IgA	12 ml	Anti-human IgA conjugate (ten times the concentration) From rabbit, contains NaN ₃

IgM Detection

For the detection of IgM antibodies the following additional reagent supplementary to recomLine Yersinia IgA is available:

CONJ IgM	12 ml	Anti-human IgM conjugate (ten times the concentration)
Art. Nr. 10075		From rabbit, contains NaN ₃

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water, vacuum extraction system with disinfection trap, micro pipettes, plastic forceps, shaker, metric cylinder with graduations, scales.

Incubation trays (can be obtained from MIKROGEN GmbH)

7. Information on test and reagents

7.1 Precautions

- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates contain sodium azide. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121°C for at least 1 hour.
- ☞ Use incubation trays only once.
- ☞ Handle strips carefully with a plastic forceps.

7.2 Handling information

Store reagents before and after use at 2°C - 8°C, **do not freeze**. Temper all components before starting the test for at least 30 minutes to 18°C - 25°C (room temperature). Both the test and incubation procedures are carried out at room temperature.

Mix the concentrated conjugates well before use. Mix the patient sera well before use as well.

Do not open the tube containing the test strips until just before use to avoid condensation of water. The strips that are not used must be left in the tube and stored further at 2°C - 8°C (reclose tube tightly, test strips must not become moist before testing!).

A quality guarantee can only be given up to the expiry date on the packages.

Only reagents with lot numbers corresponding to the respective lot number on the label of the kit package may be used.

The test must be performed by well-trained and authorised qualified personnel.

In case of substantial modifications of the product or the instructions for use, the application of the test might differ from the purpose intended by MIKROGEN.

Automation is possible, please refer to MIKROGEN for details.

7.3 Preparation of solutions

7.3.1 Preparation of ready-to-use wash buffer

This buffer is used for both serum and conjugate dilution as well as for the washing steps.

Prior to dilution, the volume of wash buffer required for the corresponding number of tests must be determined.

The skim milk powder is first dissolved in wash buffer concentrate. This mixture is then filled up with deionised water to the final volume (dilution: 1 + 9). See Table 1 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Ready-to-use wash buffer can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

Table 1: Wash buffer per test strip used

Test strips used	Skim milk powder	Wash buffer concentrate	Deionised water	Ready-to-use wash buffer
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5 g	50 ml	450 ml	500 ml

7.3.2 Preparation of conjugate solutions

The conjugate solution for the IgG, IgM resp. IgA test is to be prepared immediately before use. It is not possible to store the ready-to-use conjugate solution.

One part of IgG, IgM resp. IgA conjugate concentrate is diluted with 9 parts of ready-to-use wash buffer (1 + 9).

See Table 2 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Table 2: Volumes for anti-human IgG, IgM resp. IgA conjugate dilution

Test strips used*	IgG / IgM / IgA conjugate concentrate	Ready-to-use wash buffer	Ready-to-use conjugate dilution
1	0,2 ml	1,8 ml	2 ml
2	0,4 ml	3,6 ml	4 ml
3	0,6 ml	5,4 ml	6 ml
5	1 ml	9 ml	10 ml
10	2 ml	18 ml	20 ml
20	4 ml	36 ml	40 ml
25	5 ml	45 ml	50 ml

* The volumes have been calculated without dead volume. Depending on handling (manually or by machine processing) please prepare conjugate solution for additional 1 to 3 strips.

7.3.3 Substrate solution

The substrate is ready for use! Bring to room temperature (18°C - 25°C) before starting the colour reaction.

Avoid contamination of the unused substrate solution by nonsterile pipette tips, etc. at all costs since this may affect test sensitivity.

7.4 Storage and stability

Store reagents at 2°C - 8°C before and after use.

Ready-to-use wash buffer can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

The conjugate solution is to be prepared always freshly.

8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. Heat-inactivated samples may result in raised background reaction levels. A microbial contamination of the sample has to be avoided at all costs. Insoluble substances are to be removed from the sample prior to incubation by means of centrifugation.

Use of lipaemic, haemolytic or turbid samples may result in a dark background in the *recomLine Yersinia IgG/IgA/IgM*. These samples may also result in false results and should therefore not be used.

Important!

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2°C - 8°C. Longer storage of the samples is possible at -20°C or below. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.

9. Test procedure

9.1 General

The reproducibility of the results depends to a great extent on consistent washing of the strips. The washing frequencies described under 0. and 9.5 should therefore always be maintained.

9.2 Incubation of samples

1. One well in the incubation tray (see 6) is required per sample to be tested. **2 ml** of ready-to-use wash buffer is pipetted into each well. Then one test strip is carefully dipped into each of the wells filled with ready-to-use wash buffer using a plastic forceps. The strip number must face upwards

Important!

The strip must be completely wet and immersed in the ready-to-use wash buffer.

Record the tube and strip numbers used on the evaluation sheet.

2. Adding the samples

IgG/IgM/IgA test procedure: **20 µl** of an undiluted sample (human serum or plasma) is pipetted into the proper wells (**dilution 1 + 100**).

Please be sure to add the sample at one end of the immersed strips into the wash buffer and mix as soon as possible by shaking the tray carefully.

Record the sample numbers and the immunoglobulin class (IgG, IgM, IgA) on the evaluation sheet.

Cover the incubation tray with the plastic lid and incubate for **1 hour** at room temperature while shaking gently.

Important!

Make sure the incubation solutions are not carried over into other wells; be particularly careful to avoid splashing when opening and closing the lid.

9.3 Washing

1. Following incubation, the plastic lids are carefully removed from the incubation trays.
2. The serum dilution is carefully aspirated from the individual wells.

Important!

When the solutions have been aspirated from a well, the pipette tip has to be changed or rinsed well with deionised water after each aspiration procedure to prevent cross-contamination.

In the case of machine processing the references of the equipment manufacturer have to be considered.

3. Then place **2 ml** of the ready-to-use wash buffer in each well and wash on the shaker while shaking gently for **5 minutes**. The wash buffer is aspirated after the washing procedure.
4. Carry out the washing step under 3. a total of **three times**.

9.4 Incubation with peroxidase conjugate

After washing the strips, place **2 ml** of the appropriately prepared **conjugate solution** (see Table 2) into each well and incubate for **45 minutes** while shaking gently at room temperature, whereby the incubation tray is covered with the plastic lid.

9.5 Washing

The conjugate solutions are aspirated from the wells and the strips are washed again (see 0).

9.6 Substrate reaction

1. Add **1.5 ml substrate solution** into each well and incubate for **5 - 10 minutes**, shaking gently and under observation, at room temperature.
2. You should terminate the reaction as soon as the cutoff control band can be seen.

9.7 Stopping the reaction

1. After the solution is aspirated, wash the strips briefly **three times with deionised water**.
2. Use a plastic forceps to remove the strips carefully from the water and place them between 2 layers of absorbent paper to dry for about 2 hours. The strips may be adhesively attached to the enclosed evaluation sheet and the results may be recorded.
3. The strips should be stored protected from exposure to light.

10. Summary of the test procedure

1.	bring all reagents to room temperature
2.	deposit the strips in 2 ml ready-to-use wash buffer and take care that they are completely immersed in the ready-to-use wash buffer
3.	pipette 20 µl of the sample
4.	incubate for 1 hour at room temperature while shaking gently
5.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer for 5 minutes each time
6.	add 2 ml appropriately prepared conjugate solution
7.	incubate at room temperature for 45 minutes while shaking gently
8.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer for 5 minutes each time
9.	add 1.5 ml of the substrate solution, incubate while shaking at room temperature for 5 - 10 minutes
10.	wash the strips at least three times with deionised water
11.	dry the strips between 2 layers of absorbent paper for 2 hours and read off the result

11. Evaluation

11.1 Evaluation of band intensity

1. On the enclosed evaluation sheet, record the date, lot and tube number along with the antibody class detected.
2. Enter the sample identification number on the protocol sheet.
3. Now attach the corresponding test strips with a glue stick into the corresponding fields of the evaluation sheet. To do this, place the test strips with the reaction control band on the marking lines. Then use clear adhesive tape to attach the test strips left from the marking line. Complete sticking of the test strip with glue or adhesive tape may lead to aberrations of the colouring.
4. Now identify the bands of the developed test strips based on the printed control strip on the evaluation sheet and record them in the protocol sheet (Table 3). Identify the bands on the test strips separately for the respective immunoglobulin classes.

11.2 Control results

The test can be evaluated if the following criteria are met:

- Reaction control band (upper line) pronounced colour, dark band
- Antibody class (second to fourth bands): The corresponding conjugate control band must show a clear colour reaction. The two other conjugate control bands may develop a weak, non-specific colouring.
- Cutoff control (fifth band): weak, but clearly evident colouring.

Table 3: Intensity of bands in relation to the cutoff band

Bands	Intensity
No reaction	-
Intensity weaker than the cutoff band	±
Same intensity as the cutoff band	+
Strong intensity (stronger than the cutoff band)	++
Very strong intensity	+++

Important!

The band patterns in *recomLine* Yersinia IgG, IgM and IgA detection tests may show varying intensities. It is possible that the IgG *recomLine* will show more intense and darker bands than the IgM resp. IgA *recomLine*. The intensity of the protein bands depends on the concentration of the Yersinia-specific antibodies.

11.3 Test results and test interpretation

Results of IgG, IgA and IgM testing should always be evaluated together in order to interpret the Yersinia immuno status.

The interpretation criteria apply to all three antibody classes IgG, IgA and IgM:

<ul style="list-style-type: none"> • no bands (-) • or bands with a weaker (+/-) intensity than the cutoff control. • or an isolated band (except YOP D-band) with the same (+) or a stronger (++) intensity than the cutoff control. 	negative
<ul style="list-style-type: none"> • no YOP D-band (-) but at least two other bands with the same (+) or a stronger (++) intensity than the cutoff control. • or weak YOP D-band (+/-) and at least two other bands with the same (+) or a stronger (++) intensity than the cutoff control. 	borderline
<ul style="list-style-type: none"> • the YOP D band displays the same (+) or a stronger (++) intensity than the cutoff control, independent of the reactivity of the other bands 	positive

11.4 Notes on interpretation of the results

Following Yersinia infection IgM antibodies disappear usually within three to six month, anti-Yersinia-IgA can be detected a few month more, whereas IgG persists for years. Accompanied with chronic Yersiniosis or immune-pathologic complications like arthritis typically very high IgA - beside IgG - titers can be seen over long periods. It is important to incorporate the results of the IgG- and IgM determination for an interpretation of the IgA reactivity.

Questionable results according to the scheme of interpretation should be repeated after three to five weeks.

Isolated positive IgA results require an accurate interpretation. A fresh infection or long-term persistent antibodies are to be considered.

Serological test results should always be considered in connection with the clinical picture. A close cooperation with the treating physician is recommended.

IgG titers persist over years; according to the literature, about 30 - 40 % of the German population display anti-Yersinia IgG antibodies. The prevalence of anti-Yersinia IgA antibodies in the German population is about 11 %. From a total of 2000 patient sera examined in a clinical laboratory a portion of about 50% was found positive in IgG and about 25% in IgA. Typically, the corresponding serological picture can be described as follows: IgG antibodies against the YOP D and possibly other YOPs with a weak or no IgA antibody reaction and no IgM antibody reaction.

A Yersinia derived reactive arthritis is typically shown by a high IgG and IgA titer whereas the IgM titer is low or absent.

A Yersinia triggered reactive arthritis is typically shown by a high IgG and IgA titer whereas the IgM titer is low or absent.

Dark test stripes: A few sera of patients may generate a dark general or patterned colouring on the whole nitrocellulose stripe (e.g. sera of patients with milk protein allergies) For this different factors according to the patient serum are responsible. The evaluation of these stripes is usually possible only with some restrictions. E.g. "inverse" bands (white bands on dark background) are assessed as negative. The corresponding serum should strictly be retested by use of other serological methods.

12. Clinical results

Table 4: Comparison of the Widal agglutination test with *recomWell Yersinia* and *recomLine Yersinia*. Widal results are displayed as titers. *recomWell Yersinia* results are displayed as Units. Grey fields = positive results and white fields = negative results.

Serum	Widal								
	Serotyp			<i>recomWell Yersinia</i>			<i>recomLine Yersinia</i>		
	<i>Y. ent.</i>		<i>Y. pseud.</i>	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
	O3	O9	Typ1						
1	1:1600	<1:100	<1:100	215	171	296	positive	positive	positive
2	1:800	<1:100	<1:100	118	112	296	positive	positive	positive
3	1:200	<1:100	<1:100	215	171	296	positive	positive	positive
4	1:800	<1:100	<1:100	215	171	296	positive	positive	positive
5	1:400	<1:100	<1:100	215	171	155	positive	positive	positive
6	<1:100	1:100	<1:100	215	64	68	positive	positive	positive
7	<1:100	<1:100	<1:100	218	55	12	positive	positive	negative
8	<1:100	<1:100	<1:100	218	117	16	positive	positive	negative
9	<1:100	<1:100	<1:100	198	110	10	positive	positive	negative
10	<1:100	<1:100	<1:100	147	150	10	positive	positive	negative
11	<1:100	<1:100	<1:100	218	74	13	positive	positive	negative
12	<1:100	<1:100	<1:100	218	47	11	positive	positive	negative
13	<1:100	<1:100	<1:100	218	50	11	positive	positive	negative
14	<1:100	<1:100	<1:100	254	74	10	positive	positive	negative
15	<1:100	<1:100	<1:100	33	8	11	positive	negative	negative
16	<1:100	<1:100	<1:100	94	7	11	positive	negative	negative
17	<1:100	1:200	<1:100	85	13	19	positive	negative	negative
18	<1:100	<1:100	<1:100	51	6	13	positive	negative	negative
19	<1:100	<1:100	<1:100	6	4	8	negative	negative	negative
20	<1:100	<1:100	<1:100	6	7	12	negative	negative	negative

Table 5: Blood donor sera tested with *recomLine* Yersinia (n = 100).

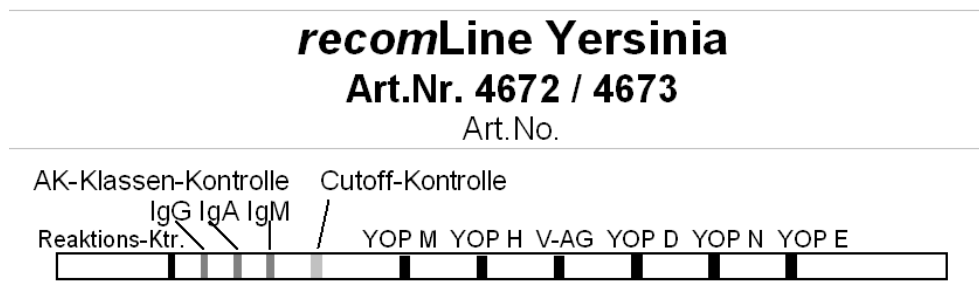
	IgG	IgA*	IgM*
positive	26	9	0
borderline	0	0	0
negative	74	91	100

* The blood donor sera displayed mainly weak reactivities in the IgA testing.






13. Literature

- (1) Michale Hammer and Jürgen Wollenhaupt **Postenteritische reaktive Arthritiden and Spondarthritis.** *Deutsches Ärzteblatt* 1995, 92 (41):2738-2749
- (2) Riita Lahesmaa, Marie-Claude Shanafelt, Lawrence Steinman and Gary Peltz **Immunopathogenesis of Human Inflammatory Arthritis: Lessons from Lyme and Reaktive Arthritis.** *The Journal of Infectious Diseases* 1994, 170:978-985
- (3) Josef Cremer, Michael Putzker, Michael Faulde and Lothar Zöller **RecomLining of Yersinia plasmid-encoded released proteins: A tool for serodiagnosis.** *Electrophoresis* 1993, 14:952-959
- (4) Jorgen H. Larsen, Susanne H. Hartvig and Michael Parm **The determination of specific IgA-Antibodies to Yersinia Enterocolitica and their role in enteric infections and their complications.** *Acta path. microbiol. immunol. scan. Sect. B* 1985, 93:331-339
- (5) Riitta Lahesmaa-rantala, Jürgen Heesemann, Olli-Pekka Lehtonen, Kaisa Granfors and Auli Toivanen **Avidity of antibodies against released proteins of Yersinia spp: comparison of patients with or without reaktive arthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 1989, 48:1003-1006
- (6) Tom H. Stahlberg, Jürgen Heesemann, Kaisa Granfors and Auli Toivanen **RecomLine analysis of IgM, IgG, and IgA response to plasmid encoded released proteins of Yersinia enterocolitica in patients with or without yersinia triggered reaktive arthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 1989, 48:577-581
- (7) S. Aleksić and J. Bockemühl: **Mikrobiologie and Epidemiologie der Yersiniosen.** *Immun. Infekt.* 1990, 18, 178-85
- (8) J. Heesemann: **Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren and neue diagnostische Methoden.** *Immun. Infekt.* 1990, 18, 186-91
- (9) J.A.A. Hoogkamp-Korstanje and J. de Koning: **Klinik, Diagnostik and Therapie von Yersinia-enterocolitica-Infektionen.** *Immun. Infekt.* 1990, 18, 192-7
- (10) J.B. Kaper, Jörg Hacker: **Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements.** 1999 American Society for Microbiology, Washington, D.C.

We will be pleased to send you further literature on Yersinia diagnostics at your request.



14. Explanations of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests (number of tests)	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze (Anzahl der Ansätze)
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
CONT	Contains	Inhalt, enthält
IVD	in vitro diagnostic device	In vitro Test
LOT	Batch code	Chargen-Nummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
REF	Catalogue number	Bestell-Nummer
	Use by expiry date	verwendbar bis Mindesthaltbarkeitsdatum
	Temperature limitation Store between x°C and y°C	Lagerung bei x°C bis y°C

recomLine Yersinia IgG Artikel-Nr./ Article No.: **4672**
recomLine Yersinia IgA Artikel-Nr./ Article No.: **4673**

optional als Zusatzreagenz zu 4673 **erhältlich**:
optionally available in addition to Art.-No. 4673

Line-Assay anti-human conjugate IgM Artikel-Nr./ Article No.: **10075**

Gebrauchsinformation/ Instructions for use: GIRLYE005ADE.DOC
gültig ab/ valid from: Juli/July 2005

MIKROGEN GmbH Tel: +49 (0)89 54 80 1-0
Floriansbogen 2-4 Fax: +49 (0)89 54 80 1-100
D-82061 Neuried
Germany
www.mikrogen.de mikrogen@mikrogen.de

QM-SYSTEM zertifiziert durch:
QM System certified according to:



