

SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgG SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgA

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG- oder IgA-Antikörpern gegen *Yersinia enterocolitica* in humanem Serum oder Plasma

REF SP-005-6 G-S6 ▽ 48	REF SP-005-6 G-S12 ▽ 96	REF SP-005-6 G-S24 ▽ 2x 96
IVD In-vitro-Diagnostikum CE		
REF SP-005-6 A-S6 ▽ 48	REF SP-005-6 A-S12 ▽ 96	REF SP-005-6 A-S24 ▽ 2x 96
IVD In-vitro-Diagnostikum CE		



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · 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, 11).

Die Infektion des Menschen erfolgt über den Verzehr kontaminierter Lebensmittel (Fleisch und Wurstwaren, nicht pasteurisierte Milch), oder über kontaminiertes Trinkwasser. Eine Übertragung durch den direkten Kontakt von Mensch zu Mensch ist eher selten. Das Erregerreservoir umfasst viele Säugetierarten, wobei Nager, Haus- und Nutztierarten von besonderer epidemiologischer Bedeutung sind (6). Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 7, maximal 10 Tage. Die Erreger gelangen über die Peyerschen Plaques des Dünndarms in die lymphatischen Gewebe und induzieren eine humorale Immunantwort (10). In den ersten 2-3 Wochen nach der Infektion dominieren Antikörper vom IgA und IgM Isotyp, danach sind überwiegend IgG Antikörper nachweisbar, die im Allgemeinen über mehrere Jahre persistieren (9,11). Bei immunpathologischen Komplikationen und chronischen Yersiniosen bleiben auch IgA Antikörper über einen längeren Zeitraum nachweisbar (1). Bei Patienten mit reaktiver Arthritis können IgA Antikörper gegen *Yersinia* spezifische Antigene bis zu 1 Jahr persistieren. Bei diesen Patienten sind entsprechende Antikörper auch in der Synovialflüssigkeit nachweisbar (9). Alle humanpathogenen Yersinien besitzen ein 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).

Die klinischen Symptome einer Infektion mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* weisen Ähnlichkeiten auf. Das klinische Spektrum einer *Yersinia enterocolitica* Infektion umfasst sowohl akute intestinale Symptome (Enterocolitis, wässrige Durchfälle) als auch extraintestinale Komplikationen wie reaktive Arthritis, Erythema nodosum und Reiter-Syndrom als Folge einer *Yersinia*-Enteritis. Bei Kleinkindern führt eine Infektion häufig zu einer selbstlimitierenden Gastroenteritis mit Fieber und Erbrechen. Bei Jugendlichen manifestieren sich Infektionen meist als Lymphadenitis mit starken Bauchschmerzen, die eine akute Appendizitis vortäuschen können (8,11,12).

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
9. Rastawicki, W., Humoral response to selected antigens of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis in the course of yersiniosis in humans. I. Occurrence of antibodies to Yersinia lipopolysacharydes and Yop proteins by ELISA *Med Dosw Mikrobiol* 2006; 58(4): 303-319
10. Autenrieth, S.E. and Autenrieth, I.B., Yersinia enterocolitica: subversion of adaptive immunity and implications for vaccine development. *Int J Med Microbiol* 2008; 298(1-2): 69-77
11. Thomas, L. (Hrsg.), Labor und Diagnose. TH Books Verlagsgesellschaft FFM, 5. Auflage 1998
12. Rosner, B.M. et al., Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of Yersinia enterocolitica infections in a population-based study, Germany 2009-2013. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13, 236
13. Atkinson, S. and Williams, P., Yersinia virulence factors-a sophisticated arsenal for combating host defences. *F1000 Research* 2016, 5 (F1000 Faculty Rev.): 1370, Last updated 14 JUN 2016
14. Cambronne, E. D. and Schneewind, O., Yersinia enterocolitica Type III Secretion: yscM1 and yscM2 Regulate yop Gene Expression by a Posttranscriptional Mechanism That Targets the S'Untranslated Region of yop mRNA. *J. Bacteriol.* 2002, Vol. 184(21), 5880-5893
15. Rosqvist, R. et al., Intracellular Targeting of the Yersinia YopE Cytotoxin in Mammalian Cells Induces Actin Microfilament Disruption. *Infection and Immunity* 1991, Vol. 59(12), 4562-4569
16. Black, D.S. and Bliska, J.B., The Rho GAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol.* 2000, 37, 515-527
17. Guan, K.L. and Dixon, J.E., Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in Yersinia. *Science* 1990, 249, 553-556
18. Ruckdeschel, K. et al., Differential Contribution of Yersinia enterocolitica Virulence Factors to Evasion of Microbicidal Action of Neutrophils. *Infection and Immunity* 1996, Vol.64(3), 724-733
19. Yao, T. et al., Suppression of T and B Lymphocyte Activation by a Yersinia pseudotuberculosis Virulence Factor, YopH. *J. Exp. Med.* 1999, Vol. 190(9), 1343-1350
20. Leung, K.Y. et al., YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice. *Infection and Immunity* 1990, 58, 3262-3271
21. Pawel-Ramminger, U.v. et al., GAP activity of the Yersinia YopE Cytotoxin Specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilaments. *Mol. Microbiol.* 2000, 36(3), 737-748

Anwendungsbereich

Der **SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgG / SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgA Test** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von *Yersinia*-spezifischen IgG- bzw. IgA-Antikörpern in humanem Serum, Plasma oder Synovialflüssigkeit. Er kann sowohl als Eingangstest als auch nach positivem ELISA-Suchtest als Bestätigungstest eingesetzt werden.

Testprinzip

Der **SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgG / SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgA Test** ist ein Festphasen-immunoassay basierend auf der Verwendung rekombinanter *Yersinia*-Antigene, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fänger-moleküle für Antikörper gegen *Yersinia*-Antigene dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG- bzw. IgA-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte der farblosen Substratlösung. Die Farbintensität der Spots korreliert mit der Antikörperkonzentration. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 51 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG- bzw. IgA-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern Seramun *SpotSight®* plate oder Seramun *SpotSight®* strip Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software Seramun *SpotSight®* scan quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete Yersinien Antigene

Bezeichnung	Charakterisierung / Funktion		Bedeutung
YopB – Yersinia outer protein B (12)	42 kD	Bestandteil des Translocon	Yersinia outer proteins (Yop) sind Struktur- und Effektorproteine des Typ III Sekretionssystems humanpathogener Yersinien. Alle hier aufgeführten Yop sind hochspezifisch für humanpathogene Yersinien.
YopD – Yersinia outer protein D (12, 13)	36 kD	Bestandteil des Translocon, Regulation der Yop Expression	
YopE – Yersinia outer protein E (14, 15, 20)	27 kD	Phagozytose-Hemmung	
YopH – Yersinia outer protein H (16, 17, 18)	48 kD	Phagozytose-Hemmung	
YopM – Yersinia outer protein M (19)	45 kD	Aktivierung eukaryontischer Kinasen	
YopN – Yersinia outer protein N (7)	34 kD	Regulation der Yop Freisetzung	

*Das Molekulargewicht der Antigene wird in der Literatur nicht einheitlich wiedergegeben.

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen	
1	WELLS	Kavitäten mit Arrays	6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
IgG-Bestimmung: Farbmarkierung dunkelbraun; IgA-Bestimmung: Farbmarkierung hellbraun					
2	WASHBUF CONC 10X	Waschpuffer Seramun® Wash buffer A	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL	Probenverdünnungspuffer Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	4x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-POD-Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe
	CONJ HRP IgA	Anti-human IgA-POD-Konjugat	8 ml gebrauchsfertig violett gefärbt transparente Flasche violette Kappe	8 ml gebrauchsfertig violett gefärbt Transparent1e Flasche violette Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig violett gefärbt transparente Flasche violette Kappe
5	SUBSTR TMB	Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe
6	COVER	Abdeckfolie	2x	2x	4x
7	SWAB	Tupfer mit 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3x2	6x2	12x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 51 (10 µl Probe und 500 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Die Untersuchung von Synovialflüssigkeit ist in Einzelfällen prinzipiell möglich (Probenverdünnung analog zur Serumverdünnung 1 : 51 in Probenverdünnungspuffer). Die Interpretation der Ergebnisse obliegt jedoch der Eigenverantwortung des Labors, da die im Rahmen der Leistungsbewertung erhobenen Daten aufgrund der begrenzten Probenzahl keine allgemeine Empfehlung zulassen (s. auch S. 8 „Grenzen der Methode“).

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

• Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen • Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen • Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten • destilliertes oder deionisiertes Wasser • Fusselfreies Filterpapier • Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung • Becherglas und Messzylinder • Stoppuhr • Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional) • Auffanggefäß für infektiöse Lösungen • Seramun *SpotSight*[®] plate oder Seramun *SpotSight*[®] strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun *SpotSight*[®] scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Folienbeutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBUF CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt sein oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

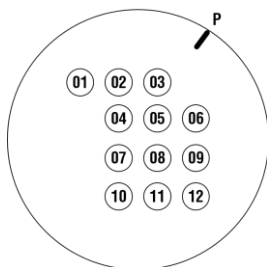
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1 : 51 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 500 µl Probenverdünnungspuffer.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgA** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers erfolgen.

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout



Parameter

04	YOP B
05	YOP D
06	YOP E
07	YOP H
08	YOP M
09	YOP N

Kontrollen

01	Positivkontrolle (PC)
02	Cut-off Kontrolle (CO)
03	Negativkontrolle (NC)
10	IgG Konjugatkontrolle (GC)
11	IgA Konjugatkontrolle (AC)
12	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO). Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameter-spezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC). Sehr schwach gefärbter Spot, die Farbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Funktionskontrolle (IgG, IgA Konjugatkontrolle, GC, AC). Intensiv gefärbte Spots mit unterschiedlicher Position beim IgG- bzw. IgA-Nachweis. Dient zur Kontrolle des Antikörperisotyps.
5. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befinden hat. Ein Wegbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf das Fehlen von Probe hin.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine der unter Punkt 1. bis 5. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*[®] Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Die Ergebnisse werden wie folgt interpretiert:

Bewertung	IgG	IgA
negativ	kein Antigenspot > Cut-off Kontrolle	kein Antigenspot > Cut-off Kontrolle
grenzwertig	YOP D = Cut-off Kontrolle oder ein Antigen-Spot außer YOP D > Cut-off Kontrolle	ein Antigenspot außer YOP D ≥ Cut-off Kontrolle
positiv	YOP D > Cut-off Kontrolle oder mindestens zwei Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle	YOP D > Cut-off Kontrolle oder mindestens zwei Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle

Grenzen der Methode

Eine Interpretation der Ergebnisse muss in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontamination der Reagenzien oder Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide und 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) und Rheumafaktoren (500 IU/ml) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Untersuchung von Synovialflüssigkeit

Der Nachweis von anti-*Yersinia enterocolitica*-Antikörpern aus Synovialflüssigkeit ist mit dem *SeraSpot*[®] Anti-*Yersinia* IgG/IgA Test in Einzelfällen prinzipiell möglich. Im Rahmen der Leistungsbewertungsprüfungen wurden 24 Gelenkpunktate parallel im *SeraSpot*[®]-Test und einem kommerziellen Line-Immunoassay untersucht. Die Übereinstimmung lag für den Nachweis von IgG bzw. IgA bei 91,7 % bzw. 95,8 %. Aufgrund der geringen Probenzahl kann keine allgemeine Empfehlung zur Ergebnisinterpretation gegeben werden. Diese sollte unter Berücksichtigung weiterer Labordaten und klinischer Befunde durch das Labor vorgenommen werden.

Testdurchführung

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

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Diagnostische Sensitivität

Serologisch vorcharakterisierte Proben von Patienten mit dem Verdacht auf Yersiniose (n = 217 (IgG-Nachweis), n = 218 (IgA-Nachweis); Referenztest 1) wurden im *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA Test untersucht („Initiale Sensitivität“). Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum anti-Yersinia-Antikörper-Nachweis nachgetestet, wobei die im Referenztest 2 erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der im *SeraSpot*[®]-Test zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienen („Berichtigte Sensitivität“).

IgG	n = 217	Referenztest 1		
		positiv (n = 209)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 8)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgG	positiv	200	0	2
	grenzwertig	1	0	0
	negativ	8	0	6

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **96,2 %**

Berichtigte Sensitivität: **97,6 %**

IgA	n = 218	Referenztest 1		
		positiv (n = 112)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 106)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgA	positiv	95	0	28
	grenzwertig	3	0	14
	negativ	14	0	64

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **87,5 %**

Berichtigte Sensitivität: **95,2 %**

Diagnostische Spezifität

Ein Kollektiv serologisch vorcharakterisierter Blutspenderseren (n = 205; Referenztest 1) wurde im *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA Test untersucht. Proben mit diskrepanten Resultaten wurden, wie unter „Diagnostische Sensitivität“ beschrieben, getestet und bewertet.

IgG	n = 205	Referenztest 1		
		positiv (n = 33)	grenzwertig (n = 13)	negativ (n = 159)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgG	positiv	30	9	20
	grenzwertig	3	4	11
	negativ	0	0	128

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Spezifität: **80,8 %**

Berichtigte Spezifität: **87,1 %**

IgA	n = 205	Referenztest 1		
		positiv (n = 13)	grenzwertig (n = 6)	negativ (n = 186)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgA	positiv	13	2	5
	grenzwertig	0	4	6
	negativ	0	0	175

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Spezifität: **94,1 %**

Berichtigte Spezifität: **95,6 %**

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA Test untersucht und die Farbintensitäten der Spots (RAW) gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten wurden die Variationskoeffizienten (VK) ermittelt.

IgG-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	RAW \bar{x} n = 8	VK* [%]	RAW \bar{x} n = 48	VK* [%]	RAW \bar{x} n = 144	VK* [%]
YOP B	58,2	1,4	58,2	6,1	57,4	5,7
YOP D	70,4	2,2	72,4	8,7	72,5	9,0
YOP E	59,4	1,4	56,4	4,5	54,3	4,5
YOP H	37,1	4,2	32,2	14,1	32,3	11,1
YOP M	39,7	1,9	38,9	5,4	38,5	5,0
YOP N	35,7	2,1	32,3	10,6	31,6	11,0
Durchführung	1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 3 Chargen	

VK*: Der VK für RAW-Werte < 20 wurde nicht ermittelt.

IgA-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen -VK	
	RAW \bar{x} n = 8	VK* [%]	RAW \bar{x} n = 48	VK* [%]	RAW \bar{x} n = 144	VK* [%]
YOP B	22,4	2,6	22,4	9,5	23,6	8,6
YOP D	121,3	2,6	130,5	12,1	133,4	11,7
YOP M	26,8	6,0	28,3	6,2	28,4	4,9
Durchführung	1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 3 Chargen	

VK*: Der VK für RAW-Werte < 20 wurde nicht ermittelt.

Automatisierbarkeit

Proben (n = 96) mit bekannter Antikörperreaktivität wurden manuell sowie mit den Mikrotiterplatten-Prozessoren DS2[®] (Dynex Technologies; manuelle Probenvorverdünnung) abgearbeitet. Aus den gemessenen Farbintensitäten der Spots (RAW) wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

Ig-Isotyp-Nachweis	Dynex DS2[®] vs. manuelle Abarbeitung	
	r^2 IgG	r^2 IgA
YOP B	0,979	0,960
YOP D	0,993	0,978
YOP E	0,984	
YOP H	0,960	
YOP M	0,978	0,966
YOP N	0,966	

r^2 wurde nicht ermittelt, wenn mehr als 90 % der Gesamtzahl (n = 96) der untersuchten Proben keine Antikörperreaktivität für die jeweiligen Antigene zeigten.

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. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

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
2019-06-XX	Allgemein Auswertung der Ergebnisse	Generelle Überarbeitung Darstellung der Interpretation der Ergebnisse

Inkubationsschema SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgG / IgA

- | | | |
|----|---|---|
| 1. | 
100 µl
30 min

3 x Waschen | Verdünnte Probe (1 : 51)
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 2. | 
50 µl
30 min

3 x Waschen | Konjugat CONJ HRP IgG oder CONJ HRP IgA
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 3. | 
50 µl
30 min

Absaugen | Substratlösung SUBSTR TMB
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) |
| 4. | Bildaufnahme der Kavitäten
und Imageanalyse | Scanner Seramun <i>SpotSight</i> ® plate / Seramun
<i>SpotSight</i> ® strip und Software Seramun
<i>SpotSight</i> ® scan |

















 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	LOT Charge	REF Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® sind eingetragene Marken der Seramun Diagnostica GmbH.

SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgG

SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgA

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

 SP-005-6 G-S6  48	 SP-005-6 G-S12  96	 SP-005-6 G-S24  2x 96
 <i>In-vitro</i> -diagnostic device		
 SP-005-6 A-S6  48	 SP-005-6 A-S12  96	 SP-005-6 A-S24  2x 96
 <i>In-vitro</i> -diagnostic device		



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenghagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · 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, 11). The infection of humans is transmitted by the consumption of contaminated meat or sausages, unpasteurized milk or contaminated drinking water. The transmission by direct contact from person to person is rather seldom. The pathogens enter the Peyer's patches of the small intestine, disseminate to lymphoid tissues and initiate a humoral immune response (10). In the first 2-3 weeks after the infection IgA and IgM class antibodies are dominating, then IgG antibodies are mainly detectable, which usually persist for several years (9,11). In cases of immunopathological complications and chronic forms of *Yersinia* infections IgA antibodies are detectable for a longer period of time (1). In patients with reactive arthritis IgA antibodies to specific *Yersinia* antigens may persist for up to 1 year. In these patients the corresponding antibody class is also detectable in the synovial fluid (9).

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).

Although no precise data are available the assumed incubation period for *Y. enterocolitica* ranges from 2 to 10 days. 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. The clinical spectrum of *Yersinia enterocolitica* infections comprises acute intestinal symptoms (enterocolitis, watery diarrhea) as well as extra intestinal complications like reactive arthritis, Erythema nodosum and Reiter's syndrome as late sequelae of *Yersinia* enteritis. 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 (8,11,12).

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
9. Rastawicki, W., Humoral response to selected antigens of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis in the course of yersiniosis in humans. I. Occurrence of antibodies to Yersinia lipopolysacharydes and Yop proteins by ELISA *Med Dosw Mikrobiol* 2006; 58(4): 303-319
10. Autenrieth, S.E. and Autenrieth, I.B., Yersinia enterocolitica: subversion of adaptive immunity and implications for vaccine development. *Int J Med Microbiol* 2008; 298(1-2): 69-77
11. Thomas, L. (Hrsg.), *Labor und Diagnose*. TH Books Verlagsgesellschaft FFM, 5. Auflage 1998
12. Rosner, B.M. et al., Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of Yersinia enterocolitica infections in a population-based study, Germany 2009-2013. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13, 236
13. Atkinson, S. and Williams, P., Yersinia virulence factors-a sophisticated arsenal for combating host defences. *F1000 Research* 2016, 5 (F1000 Faculty Rev.): 1370, Last updated 14 JUN 2016
14. Cambronne, E. D. and Schneewind, O., Yersinia enterocolitica Type III Secretion: yscM1 and yscM2 Regulate yop Gene Expression by a Posttranscriptional Mechanism That Targets the 5' Untranslated Region of yop mRNA. *J. Bacteriol.* 2002, Vol. 184(21), 5880-5893
15. Rosqvist, R. et al., Intracellular Targeting of the Yersinia YopE Cytotoxin in Mammalian Cells Induces Actin Microfilament Disruption. *Infection and Immunity* 1991, Vol. 59(12), 4562-4569
16. Black, D.S. and Bliska, J.B., The Rho GAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol.* 2000, 37, 515-527
17. Guan, K.L. and Dixon, J.E., Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in Yersinia. *Science* 1990, 249, 553-556
18. Ruckdeschel, K. et al., Differential Contribution of Yersinia enterocolitica Virulence Factors to Evasion of Microbicidal Action of Neutrophils. *Infection and Immunity* 1996, Vol.64(3), 724-733
19. Yao, T. et al., Suppression of T and B Lymphocyte Activation by a Yersinia pseudotuberculosis Virulence Factor, YopH. *J. Exp. Med.* 1999, Vol. 190(9), 1343-1350
20. Leung, K.Y. et al., YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice. *Infection and Immunity* 1990, 58, 3262-3271
21. Pawel-Ramminger, U.v. et al., GAP activity of the Yersinia YopE Cytotoxin Specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilaments. *Mol. Microbiol.* 2000, 36(3), 737-748

Intended use

The **SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgG / SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgA test** is an *in vitro* diagnostic device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of *Yersinia*-specific IgG or IgA antibodies in human serum, plasma or synovial fluid samples. It can be used as screening assay as well as confirmatory assay after a positive ELISA result.

Principle of the test

The **SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgG / SeraSpot® Anti-Yersinia-6 IgA test** is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant *Yersinia* proteins as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96-well microtiter plates. The recombinant antigens serve as capture molecules for antibodies against *Yersinia* antigens. Bound antibodies are detected by horseradish peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG- or IgA-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots are developed by precipitated product from colorless substrate solution. Color intensity correlates to the antibody concentration. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 51 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 2

Incubation of wells with the HRP-labeled anti-human IgG- or IgA for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution **SeramunBlau®** spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light.

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the **Seramun SpotSight®** plate or **Seramun SpotSight®** strip scanner; the obtained images are interpreted by using the Software **Seramun SpotSight®** scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Used Yersinia antigens

Nomenclature	Characterization / Function	Relevance
YopB – Yersinia outer protein B (12)	42 kD	Part of the Translocon Yersinia outer proteins (Yop) are structure- and effector proteins of the Type III secretion systems of human pathogenic Yersinia. All listed Yop are high specific for human pathogenic Yersinia.
YopD – Yersinia outer protein D (12, 13)	36 kD	
YopE – Yersinia outer protein E (14, 15, 20)	27 kD	
YopH – Yersinia outer protein H (16, 17, 18)	48 kD	
YopM – Yersinia outer protein M (19)	45 kD	
YopN – Yersinia outer protein M (7)	34 kD	

*The molecular weight of the antigens differs in the literature.

Kit components

		For 48 determinations	For 96 determinations	For 2x 96 determinations	
1	WELLS	Wells with arrays	6 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	2x 12- single breakable 8-well strips in frame separately vacuum-sealed with desiccant
IgG detection: color coding dark brown; IgA detection: color coding light brown					
2	WASHBUF CONC 10X	Wash buffer Seramun® Wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap
	CONJ HRP IgA	Anti-human IgA-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored purple, transparent bottle, purple cap	8 ml ready-to-use solution, colored purple, transparent bottle, purple cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored purple, transparent bottle, purple cap
5	SUBSTR TMB	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap
6	COVER	Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB	Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x2	6x2	12x2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. 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. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 51 (e.g. 10 µl sample and 500 µl sample diluent) with the ready-to-use sample diluent.

For individual cases the investigation of synovial fluid is possible in principle. A sample dilution of 1:51 is recommended (e.g. 10 µl sample and 500 µl sample diluent). Due to the limited number of tested samples a common recommendation for result interpretation cannot be given. The responsibility lies with the laboratory's own authority.

Materials required but not provided

- Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Reagent container for multi-channel micro-pipettes
- Distilled or deionized water
- lint-free absorbent paper
- Test tubes (1 ml) for sample dilution
- Beaker and measuring cylinder
- stop watch
- Washer for 96-well microtiter plates (optional)
- Collecting devices for infectious material
- Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*® scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtiter plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or de-ionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water. The substrate **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Performance at room temperature (18...25 °C) and at the specified incubation times.

For the handling of *SeraSpot*[®] tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipet tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells using the swab **SWAB** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

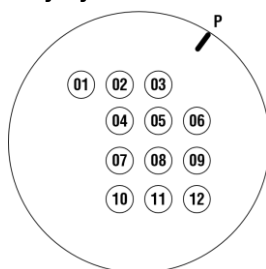
1. Warm all reagents to room temperature before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1 : 51 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 500 µl sample dilution buffer.
3. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgA** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (aspirate and discard conjugate), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **SUBSTR TMB** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (aspirate and discard substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
11. Clean bottom of wells with Swab **SWAB**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*[®] plate or the Seramun *SpotSight*[®] strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*[®] scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*[®] strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

Aspiration and washing steps can be performed manually or via washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when the plate is stored in the dark.

Test evaluation

Array layout



Parameter	
04	YOP B
05	YOP D
06	YOP E
07	YOP H
08	YOP M
09	YOP N

Controls	
01	Positive control (PC)
02	Cut-off control (CO)
03	Negative control (NC)
10	IgG conjugate control (GC)
11	IgA conjugate control (AC)
12	Serum control (SC)

P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA tests include the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO). Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC). Pale spot with intensity lower than Cut-off control
4. IgG, IgA conjugate control (GC, AC). Intensively stained spots with different position for IgG and IgA antibody detection. Serving as antibody isotype control.
5. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 5 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun *SpotSight*[®] scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed according to the following classification:

Result Interpretation	IgG	IgA
negative	no antigen spot > Cut-off control	no antigen spots > Cut-off control
borderline	YOP D = Cut-off control or one antigen-Spot except YOP D > Cut-off control	one antigen-Spot except YOP D ≥ Cut-off control
positive	YOP D > Cut-off control or at least two antigen spots > Cut-off control	YOP D > Cut-off control or at least two antigen spots > Cut-off control

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. Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) and rheumatoid factors (500 IU/ml) do not interfere with the test.

Investigation of synovial fluid

In individual cases the detection of anti-*Yersinia enterocolitica* antibodies in synovial fluid with the *SeraSpot*[®] Anti-*Yersinia*-6 IgG/IgA test is possible in principle. In the course of performance evaluation studies a total of 24 joint punctate samples were tested in parallel by *SeraSpot*[®] Anti-*Yersinia*-6 IgG/IgA and a commercially available line immunoassay. The overall agreement for IgG and IgA antibody detection was 91.7 % and 95.8 % resp. Due to this limited number of samples there is no common recommendation for a final result interpretation. Result interpretation should be conducted by the laboratory in consideration of further laboratory data and clinical findings.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity

Serologically pre-determined samples (n = 217 (IgG determination), n = 218 (IgA determination), reference test 1) of patients with suspect of Yersiniosis were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA test ("Initial sensitivity"). Samples with discrepant results were retested in a second assay for detection of anti-Yersinia antibodies. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results ("Amended sensitivity").

IgG	n = 217	Reference test 1		
		positive (n = 209)	borderline (n = 0)	negative (n = 8)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgG	positive	200	0	2
	borderline	1	0	0
	negative	8	0	6

Borderline samples were valued positive.

Initial sensitivity: **96.2 %**

Amended sensitivity: **97.6 %**

IgA	n = 218	Reference test 1		
		positive (n = 112)	borderline (n = 0)	negative (n = 106)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgA	positive	95	0	28
	borderline	3	0	14
	negative	14	0	64

Borderline samples were valued positive.

Initial sensitivity: **87.5 %**

Amended sensitivity: **95.2 %**

Diagnostic specificity

A total of 205 predetermined blood donors (Reference test 1) were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA test. Samples with discrepant results were retested and assessed as described in "Diagnostic sensitivity".

IgG	n = 205	Reference test 1		
		positive (n = 33)	borderline (n = 13)	negative (n = 159)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgG	positive	30	9	20
	borderline	3	4	11
	negative	0	0	128

Borderline samples were valued positive.

Initial specificity: **80.8 %**

Amended specificity: **87.1 %**

IgA	n = 205	Reference test 1		
		positive (n = 13)	borderline (n = 6)	negative (n = 186)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Yersinia-6 IgA	positive	13	2	5
	borderline	0	4	6
	negative	0	0	175

Borderline samples were valued positive.

Initial specificity: **94.1 %**

Amended specificity: **95.6 %**

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgA test. Color intensity (RAW) of spots was recorded and the coefficients of variation (CV) were calculated.

IgG detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	RAW [\bar{x}] n = 8	CV* [%]	RAW [\bar{x}] n = 48	CV* [%]	RAW [\bar{x}] n = 144	CV* [%]
YOP B	58.2	1.4	58.2	6.1	57.4	5.7
YOP D	70.4	2.2	72.4	8.7	72.5	9.0
YOP E	59.4	1.4	56.4	4.5	54.3	4.5
YOP H	37.1	4.2	32.2	14.1	32.3	11.1
YOP M	39.7	1.9	38.9	5.4	38.5	5.0
YOP N	35.7	2.1	32.3	10.6	31.6	11.0
Procedure	1 operator, 8x determinations, 1 batch		1 operator, 8x determinations, 2x testings per day, 3 days, 1 batch		1 operator, 8x determinations, 2x testings per day, 3 days, 3 batches	

CV*: The CV for RAW-values < 20 has not been determined.

IgA detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	RAW [\bar{x}] n = 8	CV* [%]	RAW [\bar{x}] n = 48	CV* [%]	RAW [\bar{x}] n = 144	CV* [%]
YOP B	22.4	2.6	22.4	9.5	23.6	8.6
YOP D	121.3	2.6	130.5	12.1	133.4	11.7
YOP M	26.8	6.0	28.3	6.2	28.4	4.9
Procedure	1 operator, 8x determinations, 1 batch		1 operator, 8x determinations, 2x testings per day, 3 days, 1 batch		1 operator, 8x determinations, 2x testings per day, 3 days, 3 batches	

CV*: The CV for RAW-values < 20 has not been determined.

Automation

Samples (n = 96) of known antibody titer (IgG and IgA) were assayed manually or by use of the microplate processor DS2[®] (Dyner Technologies; manual sample dilution). Color intensity (RAW) of spots was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r^2 for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

Ig isotype detection	Dyner DS2 [®] vs. manual processing	
	r^2 IgG	r^2 IgA
YOP B	0.979	0.960
YOP D	0.993	0.978
YOP E	0.984	
YOP H	0.960	
YOP M	0.978	0.966
YOP N	0.966	

r^2 was not determined if more than 90 % of the total number (n = 96) of the samples showed no antibody reactivity for the particular antigens.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, washing buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

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.

In particular 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
2019-06-xx	General Test evaluation	General revision Presentation of result interpretation

Incubation scheme *SeraSpot*[®] Anti-Yersinia-6 IgG / IgA

- | | | |
|----|---|---|
| 1. | 
100 µl
30 min | diluted sample (1 : 51)
incubation (room temperature) |
| | 
3 x wash | with wash solution, each 400 µl per well |
| 2. | 
50 µl
30 min | conjugate CONJ HRP IgG or CONJ HRP IgA
incubation (room temperature) |
| | 
3 x wash | with wash solution, each 400 µl per well |
| 3. | 
50 µl
30 min | substrate SUBSTR TMB
incubation (room temperature, protected from light) |
| | 
aspiration | |
| 4. | imaging of wells and image analysis | scanner Seramun <i>SpotSight</i> [®] plate / Seramun <i>SpotSight</i> [®] strip and software Seramun <i>SpotSight</i> [®] scan |

 Manufacturer	 Date of manufacture	 Use by	LOT Batch code	REF Catalog number
 Keep away from sunlight	 Temperature limits	 Biological risks	 Do not reuse	
 Consult instructions for use	 Caution	IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device	 Contains sufficient for <n> tests	

SeramunBlau[®], *SeraSpot*[®] und Seramun *SpotSight*[®] are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.