

**VIROTECH Yersinia enterocolitica IgG/IgA ELISA
(Y. enterocolitica IgG/IgA ELISA)**

Bestell-Nr.: EC142.00

Farbcodierung: grün metallic/transparent

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt (IgG und IgA Testkit)	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	5
8. Testdurchführung	5
8.1 Untersuchungsmaterial	5
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung.....	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	6
9. Testauswertung	6
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE).....	6
9.3 Auswertungsschema IgG und IgA	6
9.4 Grenzen des Tests.....	7
10. Leistungsdaten	7
10.1 Sensitivität und Spezifität	7
10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)	7
10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	8
10.4 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	8
11. Literatur	8
12. Testablaufschemata	9

1. Verwendungszweck

Der VIROTECH *Yersinia enterocolitica* ELISA dient dem qualitativen und semiquantitativen Nachweis von spezifischen IgG/IgA Antikörpern im Humanserum, die gegen Antigene des 70kb Virulenz-Plasmids pathogener *Yersinien* gerichtet sind. Bei dem eingesetzten Antigen handelt es sich um eine Mischung aus gereinigten nativen Yops (*Yersinia* outermembrane proteins) und rekombinanten YopB, YopD und YopE. Die Antigene YopD und YopE erwiesen sich sowohl bei Infektionen im IgG, IgM und IgA, als auch bei der reaktiven Arthritis im IgA, als die immundominanten Antigene und ermöglichen damit eine sichere Diagnostik (11, 13, 14, 15). Der Nachweis erhöhter Antikörperkonzentrationen trägt zur Diagnose einer *Yersinien*-induzierten Arthritis bei. Zur Diagnosestellung von akuten enteritischen Erkrankungen ist der Test nicht geeignet.

2. Diagnostische Bedeutung

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie umfasst neben den humanpathogenen Vertretern *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* weitere nicht-pathogene Spezies (1).

Yersinien kommen weltweit in gemäßigten und subtropischen Klimaten vor. Die wichtigsten Keimreservoirs für *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, die Erreger der enteralen *Yersiniose*, sind latent infizierte, warmblütige Wild-, Nutz- und Haustiere (vor allem Hausschweine), über deren Ausscheidungen es zur Kontamination der Umwelt kommt (2, 3). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt überwiegend alimentär.

Y. enterocolitica-Infektionen manifestieren sich nach ca. 14-tägiger Inkubationszeit vorwiegend als mesenteriale Lymphadenitis, die sich klinisch als Enteritis, Pseudoappendizitis, Ileitis oder Colitis darstellt (4). Außerdem können extramesenteriale Formen (20-30% der Fälle), lokale Infektionen nach Dissemination, septische Formen und das Lymphadenopathiesyndrom - entweder mit oder ohne vorangegangener Enteritis - auftreten.

Zu den häufigsten immunpathologischen Komplikationen einer *Y. enterocolitica*-Infektion gehören die reaktive Arthritis (häufig bei HLA B27 positiven Patienten) (5, 6) und das Erythema nodosum (7). Reaktive Arthritiden treten typischerweise nach einem symptomfreien Intervall von 1 bis 3 Wochen, vor allem in den Gelenken der unteren Körperhälfte, auf (8).

Wesentliche Faktoren der Pathogenität der *Yersinien* sind an das Vorhandensein eines Virulenzplasmids gekoppelt, welches u.a. für virulenz-assoziierte Releaseproteine, auch Yops genannt (*Yersinia* outermembrane proteins), codiert.

Diese Yops werden nur von human-pathogenen *Yersinia*-Stämmen gebildet (DNS-Sequenzhomologie 70 - 100%). Daher ist der Nachweis der Antikörper gegen diese Releaseproteine eine hoch spezifische und sehr sensitive Methode für die serologische Diagnostik aller *Yersiniose*-Formen (9).

In der akuten Phase (10-14 Tage nach der Infektion) sind in der Regel klassenspezifische Antikörper (IgM, IgA und IgG) gegen die verschiedenen Releaseproteine nachweisbar (10). Allerdings werden nicht immer gegen alle *Yersinien*-antigene Antikörper generiert. Auch werden nicht immer alle Antikörperklassen gebildet (11).

IgM-Antikörper treten in engem zeitlichen Zusammenhang mit der klinischen Manifestation möglicher immunpathologischer Komplikationen (reaktive Arthritis; Erythema nodosum) auf und persistieren in den meisten Fällen nur 1-3 Monate bzw. verschwinden regelmäßig innerhalb von 6 Monaten (12).

Ebenfalls von Bedeutung ist die IgA-Antwort, da diese Antikörperklasse bei aktiver *Yersiniose* fast immer nachweisbar ist. Die IgA-Reaktivität kann bei unkompliziertem Verlauf ca. 2 - 6 Monate anhalten. Bei chronischen *Yersiniosen* kann die IgA-Reaktivität 2 - 3 Jahre - in Einzelfällen auch länger - persistieren (12). Entsprechende Kontrollen der serologischen Befunde haben deshalb nur in größeren Zeitabständen von 4 - 6 Monaten einen Sinn. IgG-Antikörper persistieren über Jahre hinweg.

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

Serologische Untersuchungen sollten als Stufendiagnostik durchgeführt werden. Als 1. Stufe empfiehlt sich der Ig-Klassen spezifische, eher sensitiv eingestellte ELISA. Als 2. Stufe sollte der spezifischere *Yersinia enterocolitica* LINE zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse bzw. zur Bestätigung positiver Ergebnisse angeschlossen werden.

4. Packungsinhalt (IgG und IgA Testkit)

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgA negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
8. **IgA cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
9. **IgA positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
10. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
11. **IgA-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
12. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
13. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	verdünnt	+2 bis +8°C	max. 6h
	unverdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach Öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
RF Sorbo Tech	unverdünnt, nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
Stopplösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopplösung und TMB, wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
3. Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Reagenzgläser
5. Zellstofftücher
6. Abdeckung für ELISA-Platten
7. Abfallbehälter für infektiöses Material
8. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
9. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
10. Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen, cut-off und der positiven IgG- und IgA-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).

9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschemata siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden.

Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG- und IgA-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

$$VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{OD \text{ (positive Kontrolle)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$$

$$VE \text{ (Patientenserum)} = \frac{OD \text{ (Patientenserum)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$$

9.3 Auswertungsschema IgG und IgA

Ergebnis (VE)	Beurteilung
< 9,0	negativ
9,0 – 11,0	grenzwertig

> 11,0	positiv
--------	---------

- Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
- Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen grenzwertigen Bereiches, liegt keine signifikant hohe Antikörperkonzentration vor; die Proben werden als grenzwertig betrachtet. Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen. Eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich.
- Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.

9.4 Grenzen des Tests

- Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
- Der Yersinia enterocolitica ELISA ist nicht zur Diagnosestellung von akuten enteritischen Erkrankungen geeignet.
- Sowohl die IgA, als auch die IgG Western Blot Ergebnisse sollten bei der Diagnose von Patienten mit Verdacht auf Yersiniose einbezogen werden.

10. Leistungsdaten

10.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden im IgG 143 Seren getestet. Als Referenz diente der VIROTECH Yersinia enterocolitica LINE.

Befund	VIROTECH Yersinia enterocolitica ELISA IgG		
	Negativ	Grenzwertig	Positiv
Negativ	65	6	3
Grenzwertig	10	7	3
Positiv	4	7	38

In Bezug auf den Befund ergibt sich für IgG eine Sensitivität von 90,5 % bzw. eine Spezifität von 95,6 % .
Die grenzwertigen Ergebnisse gehen in die Berechnung der Sensitivität/ Spezifität nicht ein.

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden im IgA 144 Seren getestet. Als Referenz diente der VIROTECH Yersinia enterocolitica LINE.

Befund	VIROTECH Yersinia enterocolitica ELISA IgA		
	Negativ	Grenzwertig	Positiv
Negativ	117	1	2
Grenzwertig	7	2	0
Positiv	9	1	5

In Bezug auf den Befund ergibt sich für IgA eine Spezifität von 98,3 %.
Eine prozentuale Angabe zur Sensitivität kann aufgrund der geringen Anzahl der positiven Seren nicht gemacht werden.
Die grenzwertigen Ergebnisse gehen in die Berechnung der Sensitivität/ Spezifität nicht ein.

10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)

Es wurden 80 Blutspenderseren im IgG und im IgA getestet.

n = 80	IgG		IgA	
	Anz.	%	Anz.	%
Negativ	52	65,0	77	96,2
Grenzwertig	11	13,7	2	2,5
Positiv	17	21,3	1	1,3

10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit einem Serum getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt für IgG < 9%.

10.4 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 3 Seren getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten liegen unter 15%.

11. Literatur

1. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, 1997
2. K. Ito et. al., "Colonization in the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*." *Contrib Microbiol Immunol* 1991; 12: 63-7.
3. Fachinformation Labkrone website, "Yersinia" (08/2010)
4. J. de Koning et. al., "Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen." *Immun. Infekt.* 18 (6/90), 192-197.
5. H. Zeidler et. al, Yersinien-induzierte Arthritiden : Neue Erkenntnisse in Pathogenese, Diagnostik und Therapie. *Rheumatologie-Hannover, WMW Nr.12, 1990 306-311*
6. J-U Asmussen et.al,-Long term prognosis in *Yersinia* arthritis: clinical and serological findings. *Annals of the Diseases* 1992;51:1332-1334
7. Kern et. al., "*Yersinia-enterocolitica*-infektion mit extraintestinaler Manifestation: Fallbericht und Übersicht." *Z. Gastroenterol* 1994; 32: 152-156
8. www.rheuma-online.de "Yersinien-induzierte Arthritis" (06/2003)
9. Cornelis G.R. et. al.: "The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome." *Microbiol-Mol-Biol-Rev.* 1998 Dec; 62(4): 1315-52
10. *The Journal of infectious diseases*, Vol. 157, No. 3, March 1988, pages 601-602.
11. Stahlberg T. H., Granfors K., Toivanen A.: "Immunoblot analysis of human IgM, IgG and IgA responses to plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* serovar O3" *J.Med.Microbiol.-Vol.24(1987),157-163.*
12. *Reviews of infectious diseases*, Vol. 6, No. 3, May-June 1984, pages 421-422.
13. Gaede-K, Mack-D, Heesemann-J, "Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats"; *Med Microbiol Immunol* (1992)181;165-172.
14. Stahlberg T., Heesemann J., Granfors K., Toivanen A.: "Immunoblot analysis of IgM, IgG and IgA responses to plasmid encoded released proteins of *Yersinia enterocolitica* in patients with or without yersinia triggered reactive arthritis" *Annals of the Rheumatic Diseases* 1998; 48:577-581
15. 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* Yop proteins by Western-blot" *Med Dosw Mikrobiol.* 2006;58(4):321-8

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

IgG/IgA-Proben – Verdünnung

1:101

z.B.:

10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

Testdurchführung

Probeninkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Patientenproben Leerwert (Verdünnungspuffer) und Kontrollen
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Konjugatinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Konjugat IgG, IgA
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Substratinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Substrat
↓		
Abstoppen		50 µl Stopplösung vorsichtig schütteln
↓		
Extinktion messen		Photometer bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm)