VIROTECH Yersinia enterocolitica IgG LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgG LINE-32)

Bestell-Nr.: WE242G32

(Y. enterocolitica IgG LINE-96)

Bestell-Nr.: WE242G96

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgA LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgA LINE-32)

Bestell-Nr.: WE242A32

(Y. enterocolitica IgA LINE-96)

Bestell-Nr.: WE242A96

NUR FÜR IN VITRO DIAGNOSTIK

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH
Waldstrasse 23 A6
63128 Dietzenbach, Deutschland
Tel.: +49 6074 23698-0
Fax: +49 6074 23698-900
E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com
Webseite: clinical.goldstandarddiagnostics.com

CE

Freigabedatum 18.09.2024 11:35
REV 20 / VIROTECH Yersinia enterocolitica IgG & IgA LINE Immunoblot DE

Inhalt

1. Verwendungszweck 3
2. Diagnostische Bedeutung 3
3. Testprinzip 3
4. Packungsinhalt 4
4.1 Kit für 32 Bestimmungen 4
4.2 Kit für 96 Bestimmungen 4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien 4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise 5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert) 5
8. Untersuchungsmaterial 5
9. Testdurchführung 5
9.1 Untersuchungsmaterial 5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien 5
9.3 Immunoblot Testdurchführung 6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren 7
10. Testauswertung 7
10.1 Einsatz der Cut off Kontrolle 7
10.2 Bedeutung der Antigene 7
10.3 Auswertungskriterien 8
10.4 Grenzen des Tests 8
11. Leistungsdaten 8
11.1 Sensitivität 8
11.2 Spezifität und Durchseuchung 9
11.3 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit) 9
11.4 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit) 9
12. Literatur 9
13. Symbole 10
14. Testablaufschema 11

1. Verwendungszweck

Line Immunoblot Testkit zum qualitativen Nachweis von spezifischen IgG/ IgA Antikörpern im Humanserum, die gegen Antigene des 70kb Virulenz-Plasmids pathogener Yersinien gerichtet sind. Der Nachweis reaktiver Banden trägt zur Diagnose einer Yersinien-assoziierten Folgekrankheit (z. B. reaktive 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 Keimreservoire 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 Yersinienantigene 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.

Bei einer Austestung von deutschen Blutspendern konnten bei 41% IgG-Antikörper nachgewiesen werden (16).

3. Testprinzip

Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Humanserum/-plasma-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit dem auf den Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschritte, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG-, bzw. IgA- Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschritt entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blauviolette Banden (“Antigen-Banden”) erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der Nitrozellulosestreifen mit Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG-, bzw. IgA-Antikörpern schließen.

4. Packungsinhalt

4.1 Kit für 32 Bestimmungen

1.	**Nitrozellulose Teststreifen** mit aufgesprühten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig	**1x**	32 Streifen
2.	**IgG oder IgA Cut off Kontrolle**, Humanserum, vorverdünnt	**1x**	1,0 ml
3.	**Verdünnungs-/Waschpuffer**, pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	**2x**	50 ml
4.	**IgG- bzw. IgA- Konjugat** (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel	**1x**	0,7 ml
5.	**Substrat** (BCIP/NBT), gebrauchsfertig	**1x**	57 ml
6.	**Auswertungsprotokollblatt** zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse	**1x**	1 Stk.

4.2 Kit für 96 Bestimmungen

1.	**Nitrozellulose Teststreifen** mit aufgesprühten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig	**3x**	32 Streifen
2.	**IgG bzw. IgA Cut off Kontrolle**, Humanserum, vorverdünnt	**2x**	1,0 ml
3.	**Verdünnungs-/Waschpuffer**, pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	**4x**	50 ml
4.	**IgG- bzw. IgA- Konjugat** (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel	**3x**	0,7 ml
5.	**Substrat** (BCIP/NBT), gebrauchsfertig	**3x**	57 ml
6.	**Auswertungsprotokollblatt** zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse	**3x**	1 Stk.

Auf Anfrage zusätzlich erhältlich:

IgG bzw. IgA -Positive Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 1,0 ml.
Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikat entnehmen.
(Best.-Nr.: IgG: WE242P60 bzw. IgA: WE242P40)

IgG/IgA -Negative Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 1,0 ml.
Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.
(Best.-Nr.: IgG/IgA: WE242N20)

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

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

1. Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
2. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
3. Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
4. Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
5. **Nitrozellulose Teststreifen**: Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblassen der Banden zu vermeiden.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	unverdünnt	+2 bis +8°C	1 Woche
Teststreifen	nach Öffnen	+2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel)	3 Monate
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	ca. 6h
Substrat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate

	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	*oder* Raumtemperatur	2 Wochen

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 Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
4. Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Inkubationswanne (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
2. Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
3. Eine Spritzflasche zum Abstoppen
4. Pipette oder Handwaschgerät
5. Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
6. Pipettenspitzen
7. Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
8. Plastikpinzette
9. Aqua dest. oder deionisiert
10. Filterpapier

8. Untersuchungsmaterial

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

9. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

9.1 Untersuchungsmaterial

1. Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum oder Plasma benötigt.
2. Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma). Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
4. Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
5. Getrübte Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

9.2 Vorbereitung der Reagenzien

1. Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.

2. Vor Verdünnung alle Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
3. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
4. **Verdünnungs-/Waschpuffer**
   Der Verdünnungs-/ Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/ Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen.
   Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/ Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/ Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.
5. **IgG- bzw. -IgA-Konjugat**
   Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: „Testablaufschema“).
6. **Substratlösung**
   Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

9.3 Immunoblot Testdurchführung

Achtung: Die Nitrozellulose Teststreifen dürfen nur in der freigegebenen Ig-Klasse getestet werden (siehe Etikett auf dem Blotheftchen und Bezeichnung auf jedem einzelnen Teststreifen).

Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des Yersinia enterocolitica LINEs, muß bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.
5. Je **15µl Patientenserum/-plasma** bzw**. 100µl der Cut off / Positiven / Negativen Kontrolle** zupipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum und Kontrolle **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.
7. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrittes die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.
11. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.
12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.
14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.

15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Steifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtern Ihnen die Auswertung der Patientenproben.

Testablaufschema siehe letzte Seite

9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

10. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control)**:**
   Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.
2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control)**:**
   Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.
Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

10.1 Einsatz der Cut off Kontrolle

Banden, deren Intensität schwächer als die Cut off Bande YopD der Cut off Kontrolle sind, werden nicht in die Bewertung einbezogen.
Ebenfalls nicht in die Bewertung mit einbezogen wird die Durchseuchungsbande YopDD, die nur auf den IgG-Teststreifen aufgebracht ist. Eine YopDD Bande $\geq$ Cut-off bei negativer Serologie deutet auf einen früheren Kontakt mit Yersinia hin.

10.2 Bedeutung der Antigene

Antigen/ Bezeichnung	Molekular-gewicht	Bedeutung der Antigene	Spezifität der Antikörper im LINE
YopM (2a)	48 kD	"Yersinia outer proteins" (Yop) sind plasmidkodierte Proteine, die von den Bakterien ausgeschleust und von allen humanpathogenen Yersinien gebildet werden. V-Antigen oder auch LcrV unterliegt den gleichen Regulierungen wie die Yops und wurde nur historisch bedingt anders benannt.	Sowohl IgG als auch IgA Antikörper gegen "Yersinia outer proteins" sowie V-Ag sind hochspezifisch für eine Infektion mit pathogenen Yersinien.
YopH (2b)	45 kD		
YopB (3)	42 kD		
V-Ag (17)	38 kD		
YopD (4a)	36 kD		
YopE (5)	27 kD		

Es treten keine Kreuzreaktionen mit Salmonella thyphimurium, Campylobacter jejuni oder Brucella auf (13, 14).

Die YopDD Bande (die letzte Bande auf den Teststreifen), die nur auf dem IgG-Streifen vorhanden ist, wird nicht in die Bewertung mit einbezogen. Eine YopDD Bande bei einem negativen Befund in einer Intensität $\geq$ als die Cut Off-Bande weist auf einen früheren Kontakt mit Yersinia hin.

10.3 Auswertungskriterien

Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

Auftretende Bande(n)	Bedeutung	Beurteilung
Keine Banden ≥ Cut-off-Bande	Kein serologischer Hinweis auf eine Yersinien-Infektion oder länger zurückliegende Yersiniose.	Negativ
Eine Bande ≥ Cut-off-Bande (außer YopD)	Antikörper gegen Yersinien sind nachweisbar. Abgeschwächte Reaktion bei Rekonvaleszenz, persistierenden Antikörpern oder bei gerade beginnender Infektion. Die Anforderung einer Verlaufskontrolle ist empfehlenswert.	Auffällig
Isolierte YopD (36 kD) ≥ Cut-off-Bande	Antikörper gegen Yersinien sind nachweisbar. Über 90% der Patienten mit Yersinien-Arthritis bilden IgA-Antikörper gegen YopD. Es kann sich auch um eine frische Infektion oder persistierende Antikörper handeln.	Positiv
Zwei Banden ≥ Cut-off-Bande	Antikörper gegen Yersinien sind nachweisbar. Eine Infektion ist wahrscheinlich. IgG- und IgA-Antikörper können über Jahre persistieren.	Positiv
YopDD (Durchseuchung) ≥ Cut-off-Bande	Positive Durchseuchungsbande. Hinweis auf einen früheren Kontakt mit Yersinia	

Zur Beurteilung der IgA-Ergebnisse sollten möglichst auch die IgG-Ergebnisse berücksichtigt werden, da starke Bandenintensitäten und eine hohe Anzahl an Banden im IgG und IgA das typische serologische Bild einer Yersinien induzierten reaktiven Arthritis darstellen (8).

Der Yersinia enterocolitica LINE ist im IgG spezifisch eingestellt, damit nur deutliche Titer erfasst werden. Einen Hinweis zur allgemeinen Durchseuchung im IgG liefert die YopDD-Durchseuchungsbande, die einen früheren Kontakt mit Yersinien anzeigt.

10.4 Grenzen des Tests

1. Sowohl die IgA, als auch die IgG LINE Ergebnisse sollten bei der Diagnose von Patienten mit Verdacht auf Yersinien einbezogen werden.
2. Die Persistenz der IgA-Antikörper nach erfolgreicher Behandlung kann 6 Monate bis 3 Jahre betragen. Die IgG-Antikörper persistieren in der Regel viele Jahre.
3. Obwohl es differential-diagnostisch keine Rolle spielt, sind theoretisch Kreuzreaktionen mit Seren, die gegen Pseudomonas aeruginosa gerichtet sind, nicht völlig auszuschließen. Bei P. aeruginosa einem opportunistischen Pathogen, das normalerweise nur immunkomprimierte Individuen infiziert, konnten funktionell ähnliche, sog. „type III secretion machines“ gefunden wurden [YopB u. YopD homolog zu PopB and PopD] (18, 19).
4. Der Yersinia enterocolitica LINE ist nicht zur Diagnosestellung von akuten enteritischen Erkrankungen geeignet.
5. In seltenen Fällen können Patientenseren “inverse”-Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblot ist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

11. Leistungsdaten

11.1 Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden klinisch charakterisierte Seren im Yersinia enterocolitica LINE und in einem rekombinanten Yop D ELISA als Referenz getestet.

Sensitivität
Serenkollektiv (n=84)

Yersinia enterocolitica IgG Line Immunoblot	**Yersinia enterocolitica Yop D ELISA**		
	negativ	**auffällig**	**positiv**
negativ	12	1	0
auffällig	2	0	0
positiv	5	1	63

Yersinia enterocolitica IgA Line Immunoblot	**Yersinia enterocolitica Yop D ELISA**		
	negativ	**auffällig**	**positiv**
negativ	17	4	3
auffällig	2	0	0
positiv	11	2	45

Die Sensitivität beträgt für den Yersinia enterocolitica IgG Line Immunoblot >99,9% und für den IgA Line Immunoblot 93,8%.
Auffällige Seren wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

11.2 Spezifität und Durchseuchung

Zur Bestimmung der Spezifität wurden Blutspenderseren im Yersinia enterocolitica LINE getestet.

Yersinia enterocolitica IgG Line Immunoblot (Blutspenderseren, n=69)	
positiv	8
auffällig	1
negativ	60

Yersinia enterocolitica IgA Line Immunoblot (Blutspenderseren, n=87)	
positiv	9
auffällig	2
negativ	76

Die Spezifität beträgt für den Yersinia enterocolitica IgG Line Immunoblot 88,2% und für den IgA Line Immunoblot 89,4%. Mit der Yop DD ergibt sich im IgG eine Durchseuchungsrate von >40%.
Auffällige Seren wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

11.3 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)

Für die Ermittlung der Wiederholbarkeit wurden in einem Versuchsansatz 32 Nitrozellulose Teststreifen mit einem Serum im IgG und IgA inkubiert. Die Banden zeigen jeweils auf dem gesamten Nitrozellulose-Sheet einheitliche Intensitäten.

11.4 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden 3 Seren getestet. Die Bestimmung erfolgte in 10 verschiedenen Testansätzen von 3 Testpersonen. Es handelt sich um ein negatives Serum, ein Serum mit hoher Bandenintensität und eine cut-off Kontrolle.

In allen unabhängigen Testungen wurden die serologischen Vorgaben genau getroffen.

12. Literatur

1. Psychrembel, 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. Auli Toivanen et. al,-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-resistent Fischer rats”; Med Microbiol Immunol (1992)181;165-172.
14. Stählberg T.H., J. Heesemann, K. Granfors, A. Toivanen, (1989) : 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, 48: 577-581
15. Peter J.B. et. al.: Use and Interpretation of Laboratory Tests in Infectious Disease”, Specialty Laboratories, 1998. 262-64
16. Mäki-Ikola, O., J. Heesemann, A. Toivanen, K. Granfors.: High frequency of Yersinia antibodies in healthy populations in Finland and Germany, Rheumatol. Int., 1997, 16:227-229
17. Straley S.C. et al.: Yops of Yersinia spp. pathogenic for humans, Infection and Immunity, Aug 1993: 3105-3110
18. Schneewind O. et al.: Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals, Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Oct 26;96(22):12839-43.
19. Forsberg A. et.al.: Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of Pseudomonas aeruginosa and Yersinia pseudotuberculosis. Mol Microbiol. 1998 Sep;29(5):1155-65.

13. Symbole

Siehe Gebrauchsanweisung!

14. Testablaufschema

Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	**30 Minuten**	15 µl Patientenserum/-plasma / 100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Waschen	**3 x 5 Minuten**	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	**30 Minuten**	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100)
Waschen	**3 x 5 Minuten** **1 x 1 Minute**	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	**10 ± 3 Minuten**	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	**3 x ohne Zwischeninkubation**	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

Anzahl Streifen	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Verdünnungs/ Waschpuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugat-Konzentrat	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Endvolumen	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Anzahl Streifen	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
Verdünnungs/ Waschpuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugat-Konzentrat	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Endvolumen	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Anzahl Streifen	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**
Verdünnungs/ Waschpuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugat-Konzentrat	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Endvolumen	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Anzahl Streifen	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40**
Verdünnungs/ Waschpuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugat-Konzentrat	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Endvolumen	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml