

NovaLisa®

Yersinia enterocolitica IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use

English	2
Deutsch.....	7
Abbreviations / Abkürzungen.....	14
Packaging materials / Verpackungsmaterialien.....	14
Symbols Key / Symbolschlüssel	15
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung	16

REF

YERG0990 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The *Yersinia enterocolitica* IgG ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against antigens of the 70 kb virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* in human serum or plasma (citrate, heparin). The ELISA is intended for use as an aid in identifying individuals with an adaptive immune response to *Yersinia enterocolitica*. The determination of increased antibody levels contributes to diagnosis of *Yersinia*-induced reactive arthritis. The test is not intended for diagnosing acute enteric diseases.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with specific antigen; in resealable aluminium foil.
- **DIL:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **WASH BUF 20x:** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgG in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap.
- **SUB TMB:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 11.1

3.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

3.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

4. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

5. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

5.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with specific antigen. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

5.2. **WASH BUF 20x**

Dilute **WASH BUF 20x** 1 + 19; e. g. 10 mL **WASH BUF 20x** + 190 mL distilled water. The diluted buffer (**WASH BUF 1x**) is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g., in a water bath. Mix well before dilution.

5.3. **SUB TMB**

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. **SUB TMB** should be colourless or could have a slight blue tinge. If **SUB TMB** turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise, they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

6.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with **DIL**. Dispense 10 µL sample and 1 mL **DIL** into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems, we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of **WASH BUF 1x** from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of **WASH BUF 1x**. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL **SUB TMB** into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL **SOLN STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for the **SUB TMB**, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the **SOLN STOP**.

7.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader to zero using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these instructions for use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < 0.100
- **Negative Control:** Absorbance value < 0.200 and < Cut-off
- **Cut-off Control:** Absorbance value 0.150 – 1.300
- **Positive Control:** Absorbance value > Cut-off

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

8.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43

Cut-off = 0.43

8.2.1. Results in Units [NTU]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Units} = \text{NTU}]$$

Example:
$$\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU}$$

8.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks.
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.		

8.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection
IgA	Produced in mucosal linings throughout the body (⇒ protective barrier) Usually produced early in the course of the infection

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

9.1. Precision

Evaluation of precision of the assay was performed according to "CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014".

9.1.1. Single-Site Study

The precision study was performed at a single site. A negative, a high negative, a low positive, and a moderate positive sample were run in 4 replicates, two times per day for 12 days for a total of 96 results.

Sample	n	Mean (NTU)	Repeatability		Between Run		Within Day		Between Day		Within lab	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderate positive	96	21.50	0.8883	4.1	1.6690	7.8	1.8907	8.8	0.9469	4.4	2.1145	9.8
low positive	96	15.28	0.6923	4.5	1.0913	7.1	1.2924	8.5	0.0000	0.0	1.2924	8.5
high negative	96	8.56	0.5784	6.8	0.7467	8.7	0.9445	11.0	0.2395	2.8	0.9744	11.4
negative	96	4.60	0.4439	9.7	0.3461	7.5	0.5629	12.2	0.1438	3.1	0.5810	12.6

9.1.2. Multisite-Study

The precision study was performed at two different sites. A negative, a high negative, a low positive, and a moderate positive sample were run in 5 replicates, once a day for 5 days for a total of 50 results.

Sample	n	Mean (NTU)	Repeatability		Within Site		Reproducibility	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderate positive	50	21.68	0.6338	2.9	1.4163	6.5	2.1946	10.1
low positive	50	14.58	0.5295	3.6	1.1098	7.6	1.2922	8.9
high negative	50	8.60	0.4094	4.8	0.9157	10.6	1.2857	14.9
negative	50	3.93	0.3859	9.8	0.7162	18.2	0.9696	24.7

9.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 98.82 % (95 % confidence interval: 95.81 % - 99.86 %).

9.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 95.65 % (95 % confidence interval: 85.16 % - 99.47 %).

9.4. Interferences

The assay was evaluated for interferences according to guideline EP07-A3 ("Interference Testing in Clinical Chemistry" from the Clinical and Laboratory Standards Institute). Three samples, covering the relevant measuring range, were spiked with high levels of interferents and were tested along with the unspiked sample. The following table shows the tested substances added to patient samples at the indicated concentrations. These correspond to the recommendations in the CLSI guideline to represent pathological elevated concentrations in patient samples.

Interferent	Concentration tested
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin, unconjugated	0.4 mg/mL
Bilirubin, conjugated	0.4 mg/mL
Cholesterol	4 mg/mL
Hemoglobin	10 mg/mL
Triglycerides	15 mg/mL

No clinically significant interference effect was found for all tested substances.

9.5. Cross Reactivity

A minimum of 5 samples with antibody activities to potentially cross-reacting parameters (Adenovirus, Borrelia burgdorferi, Brucella, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumoniae, Enterovirus, Epstein-Barr virus, Helicobacter pylori, Parvovirus B19) or samples positive for ANA or rheumatoid factors, and samples from pregnant women were tested to evaluate the cross reactivity of the assay. Positive findings were additionally analyzed with a CE-marked reference assay. The results are shown in the following table.

Pathogen/Condition	Samples tested	Number of positive samples	
		Yersinia enterocolitica IgG	CE-marked reference assay
Adenovirus	15	2	4
Antinuclear antibodies (ANA)	15	3	2
Borrelia burgdorferi	15	4	4
Brucella	10	9	9
Campylobacter jejuni	8	4	5
Chlamydia pneumoniae	12	4	2
Enterovirus	15	7	5
Epstein-Barr virus (EBV)	15	3	3
Helicobacter pylori	14	6	6
Parvovirus B19	14	6	1
Pregnancy samples	14	1	0
Rheumatoid factor (RF)	13	4	5

Cross-reactions with antibodies against Adenovirus, Borrelia burgdorferi, Brucella, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumoniae, Enterovirus, Epstein-Barr virus, Helicobacter pylori, Parvovirus B19 as well as with samples from pregnant women or samples positive for antinuclear antibodies (ANA) or rheumatoid factor (RF) cannot be excluded.

Based on the prevalence values of 4-35 % for anti-Yersinia enterocolitica IgG antibodies reported in the literature, it cannot be excluded that some of the tested samples are correctly positive^{1,2}.

References

1. Granfors K, Isomäki H, Essen R von, Maatela J, Kalliomäki JL, Toivanen A. 1983. Yersinia antibodies in inflammatory joint diseases. Clin Exp Rheumatol 1:215–218.
2. Strieder TGA, Wenzel BE, Prummel MF, Tijssen JGP, Wiersinga WM. 2003. Increased prevalence of antibodies to enteropathogenic Yersinia enterocolitica virulence proteins in relatives of patients with autoimmune thyroid disease. Clin Exp Immunol 132:278–282. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02139.x.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337+P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS

12. ORDERING INFORMATION

REF	YERG0990	Yersinia enterocolitica IgG	(96 Determinations)
-----	----------	-----------------------------	---------------------

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Der *Yersinia enterocolitica* IgG ELISA dient der qualitativen Bestimmung von Antikörpern der Klasse IgG gegen Antigene des 70 kb-Virulenzplasmids von *Yersinia enterocolitica* in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin). Der ELISA ist als Hilfsmittel zur Identifizierung von Personen mit einer adaptiven Immunantwort auf *Yersinia enterocolitica* bestimmt. Die Bestimmung erhöhter Antikörperspiegel trägt zur Diagnose der *Yersinia*-induzierten reaktiven Arthritis bei. Der Test ist nicht für die Diagnose akuter Darmerkrankungen bestimmt.

2. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit spezifischem Antigen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **DIL:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **WASH BUF 20x:** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe; 0,2% (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugiertem Antikörper gegen humanes IgG in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **SUB TMB:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 11.1.

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

3.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschanlage für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

4. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

5.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit spezifischem Antigen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

5.2. WASH BUF 20x

WASH BUF 20x ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer (WASH BUF 1x) ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

5.3. SUB TMB

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. SUB TMB ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte SUB TMB blau sein, ist es kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

6. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

6.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit DIL verdünnen, z. B. 10 µL Probe und 1 mL DIL in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf bis zu fünf und das Volumen von WASH BUF 1x von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL WASH BUF 1x waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL SUB TMB in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL SOLN STOP in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe von SUB TMB pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe von SOLN STOP messen.

7.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben notieren.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **0,200** und < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

8.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off Kontrolle + 0,42 OD Cut-off Kontrolle = 0,86: 2 = 0,43

Cut-off = 0,43

8.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Einheiten} = \text{NTU}]$$

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 NTU	-
Positiv	> 11 NTU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 NTU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen.
Negativ	< 9 NTU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.
Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.		

8.3.1. Antikörper Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
IgG	Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion
IgA	Wird in den Schleimhäuten des gesamten Körpers gebildet (⇒ Schutzbarriere) Wird normalerweise früh im Verlauf der Infektion gebildet

9. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

9.1. Präzision

Die Bewertung der Präzision des Assays erfolgte gemäß "CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014".

9.1.1. Single-Site Studie

Die Präzisionsstudie wurde an einem einzigen Standort durchgeführt. Eine negative, eine hochnegative, eine schwach positive und eine mäßig positive Probe wurden in 4 Wiederholungen zweimal täglich über einen Zeitraum von 12 Tagen durchgeführt, was insgesamt 96 Ergebnisse ergab. Wiederholbarkeit (Intra-Assay-Variationskoeffizient) und Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Variationskoeffizient) wurden berechnet.

Probe	n	MW (NTU)	Wiederholbarkeit		Reproduzierbarkeit		Innerhalb eines Tages		An verschiedenen Tagen		Innerhalb des Labors	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Moderat positiv	96	21.50	0.8883	4.1	1.6690	7.8	1.8907	8.8	0.9469	4.4	2.1145	9.8
schwach positiv	96	15.28	0.6923	4.5	1.0913	7.1	1.2924	8.5	0.0000	0.0	1.2924	8.5
Hoch negativ - grenzwertig	96	8.56	0.5784	6.8	0.7467	8.7	0.9445	11.0	0.2395	2.8	0.9744	11.4
Negativ	96	4.60	0.4439	9.7	0.3461	7.5	0.5629	12.2	0.1438	3.1	0.5810	12.6

9.1.2. Multisite-Studie

Die Präzisionsstudie wurde an zwei verschiedenen Standorten durchgeführt. Eine negative, eine hochnegative, eine schwach positive und eine mäßig positive Probe wurden in 5 Wiederholungen einmal täglich über 5 Tage hinweg untersucht, was insgesamt 50 Ergebnisse ergab.

Probe	n	MW (NTU)	Wiederholbarkeit		Innerhalb eines Standortes		Reproduzierbarkeit	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Moderat positiv	50	21.68	0.6338	2.9	1.4163	6.5	2.1946	10.1
schwach positiv	50	14.58	0.5295	3.6	1.1098	7.6	1.2922	8.9
Hoch negativ - grenzwertig	50	8.60	0.4094	4.8	0.9157	10.6	1.2857	14.9
Negativ	50	3.93	0.3859	9.8	0.7162	18.2	0.9696	24.7

9.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 98,82% (95% Konfidenzintervall: 95,81% - 99,86%).

9.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 95,62% (95% Konfidenzintervall: 85,16% - 99,47%).

9.4. Interferenzen

Der Assay wurde gemäß der Richtlinie EP07-A3 ("Interference Testing in Clinical Chemistry" des Clinical and Laboratory Standards Institute) auf Interferenzen untersucht. Drei Proben, die den relevanten Messbereich abdecken, wurden mit hohen Konzentrationen von Störsubstanzen versetzt und zusammen mit der nicht versetzten Probe getestet. In der folgenden Tabelle sind die getesteten Substanzen aufgeführt, die den Patientenproben in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt wurden. Diese entsprechen den Empfehlungen in der CLSI-Richtlinie zur Darstellung pathologisch erhöhter Konzentrationen in Patientenproben.

Interferierendes Agens	Getestete Konzentration
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin, unkonjugiert	0,4 mg/mL
Bilirubin, konjugiert	0,4 mg/mL
Cholesterin	4 mg/mL
Hämoglobin	10 mg/mL
Triglyceride	15 mg/mL

Für alle getesteten Substanzen wurde keine klinisch signifikante Interferenzwirkung festgestellt.

9.5. Kreuzreaktivität

Mindestens 5 Proben mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter (Adenovirus, Borrelia burgdorferi, Brucella, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumoniae, Enterovirus, Epstein-Barr-Virus, Helicobacter pylori, Parvovirus B19, Salmonella typhi) oder Proben, die positiv auf ANA oder Rheumafaktoren reagieren, sowie Proben von schwangeren Frauen wurden getestet, um die Kreuzreaktivität des Assays zu bewerten. Positive Befunde wurden zusätzlich mit einem CE-gekennzeichneten Referenzassay analysiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Pathogen/Bedingung	Getestete Proben	Anzahl positiver Ergebnisse	
		Yersinia enterocolitica IgA	CE-gekennzeichnete Referenztest
Adenovirus	15	2	4
Antinukleäre Antikörper (ANA)	15	3	2
Borrelia burgdorferi	15	4	4
Brucella	10	9	9
Campylobacter jejuni	8	4	5
Chlamydia pneumoniae	12	4	2
Enterovirus	15	7	5
Epstein-Barr Virus (EBV)	15	3	3
Helicobacter pylori	14	6	6
Parvovirus B19	14	6	1
Schwangerenproben	14	1	0
Rheumatoid Faktor (RF)	13	4	5

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Adenovirus, Borrelia burgdorferi, Brucella, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumoniae, Enterovirus, Epstein-Barr-Virus, Helicobacter pylori, Parvovirus B19 sowie mit Proben von schwangeren Frauen oder Proben, die positiv auf antinukleäre Antikörper (ANA) oder Rheumafaktor (RF) reagieren, können nicht ausgeschlossen werden.

Angesichts der in der Literatur angegebenen Prävalenzwerte von 4-35 % für Anti-Yersinia-enterocolitica-IgG-Antikörper kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der getesteten Proben korrekt positiv sind^{1,2}.

Referenzen

1. Granfors K, Isomäki H, Essen R von, Maatela J, Kalliomäki JL, Toivanen A. 1983. Yersinia antibodies in inflammatory joint diseases. Clin Exp Rheumatol 1:215–218.
2. Strieder TGA, Wenzel BE, Prummel MF, Tijssen JGP, Wiersinga WM. 2003. Increased prevalence of antibodies to enteropathogenic Yersinia enterocolitica virulence proteins in relatives of patients with autoimmune thyroid disease. Clin Exp Immunol 132:278–282. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02139.x.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostik-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 3.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Warning



H317

Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

P261

Einatmen von Aerosol vermeiden.

P280

Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen

P302+P352

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.

P333+P313

Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362+P364

Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen

Die Reagenzien können 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan enthalten (siehe 3.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Warning



H315

Verursacht Hautreizungen.

H319

Verursacht schwere Augenreizungen.

P280

Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen

P302+P352

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.

P305+P351+P338

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.

Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P337+P313

Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

12. BESTELLINFORMATIONEN

REF

YERG0990

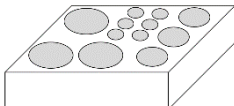
Yersinia enterocolitica IgG

(96 Bestimmungen)

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22
SOLN STOP WASH BUF 20x SUB TMB DIL CONJ CONTROL + CONTROL - CUT OFF		
 HDPE 2	 PP 5	MTP  PET / ALU / LDPE 90

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL

	Manufactured by / Hergestellt von
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung
	Expiration Date / Verfallsdatum
	Storage Temperature / Lagertemperatur
CE	CE marking / CE-Kennzeichnung
UDI	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte
CONJ	Conjugate / Konjugat
CONTROL -	Negative Control / Negativkontrolle
CONTROL +	Positive Control / Positivkontrolle
CUT OFF	Cut-off Control / Cut-off Kontrolle
DIL	Sample Dilution Buffer / Probenverdünnungspuffer
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung
SUB TMB	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung
WASH BUF 20x	“Washing Buffer (20x concentrated)”; REF W0000 Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert
WASH BUF 1x	20-fold dilution of WASH BUF 20x / 20-fach Verdünnung von WASH BUF 20x
	Contains sufficient for “n” tests / Ausreichend für “n” Tests

SCHEME OF THE ASSAY

Yersinia enterocolitica IgG

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x					
SUB TMB	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark					
SOLN STOP	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.comWebsite: clinical.goldstandarddiagnostics.com

YERG0990_IFU_rev01_fromLot_008N