
CERTEST

Yersinia
enterocolitica
O:3+O:9

ONE STEP

Yersinia enterocolitica O:3+O:9

COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



For information purposes only

For information purposes only





CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:9 in stool samples and *Yersinia* suspected colonies in stool culture.

CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card test offers a simple and a highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of *Yersinia enterocolitica* O:3 and/or *Yersinia enterocolitica* O:9 infection and it could be used to serotype of suspected isolates of *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 from selective media (stool culture).

INTRODUCTION

Yersinia enterocolitica (*Y. enterocolitica*), a Gram-negative, oxidase-negative, and facultatively anaerobic species, is highly heterogeneous and can be divided into several bioserotypes, only a few of which are known to associate with human disease. Six different biotypes (biotype 1A, 1B, 2-5) and numerous serotypes of *Y. enterocolitica* have been described. Eleven of those serotypes have frequently been associated with infections in humans. Most *Y. enterocolitica* strains associates with human yersiniosis belong to bioserotypes 1B/O:8, 2/O:5,27, 2/O:9, 3/O:3 and 4/O:3.

Yersinia enterocolitica is a common pathogen for both humans and animals. Infection with *Y. enterocolitica* can cause a variety of symptoms depending on the age of the person infected. The predominant clinical feature is abdominal pain and diarrhoea with or without fever. Arthritis and erythema nodosum are common complications. Infection with *Y. enterocolitica* occurs most often in young children. Common symptoms in children are fever, abdominal pain, and diarrhea, which is often bloody. Symptoms typically develop 4 to 7 days after exposure and may last 1 to 3 weeks or longer. There is indirect evidence that foods particularly pork products, are important sources of human infections.

The epidemiology of *Y. enterocolitica* infections is complex and poorly understood. Most cases of yersiniosis occur sporadically without an apparent source. *Y. enterocolitica* is thought to be a significant food-borne pathogen, although pathogenic isolates have seldom been isolated from foods, except from edible pig offal. In case control studies, a correlation has been demonstrated between the consumption of raw or undercooked pork and yersiniosis. Genotypes of *Y. enterocolitica* strains found in humans, further supporting the association between yersiniosis and consumption of pork.

TEST PRINCIPLE

CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in stool samples and *Yersinia* suspected colonies in stool culture.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *Y. enterocolitica* serotype O:3 and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*Y. enterocolitica* serotype O:3) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *Y. enterocolitica* serotype O:9 and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*Y. enterocolitica* serotype O:9) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

If the sample is *Y. enterocolitica* O:3 positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Y. enterocolitica* O:3 monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is *Y. enterocolitica* O:9 positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Y. enterocolitica* O:9 monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in strip B, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-*Y. enterocolitica* O:3 antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-*Y. enterocolitica* O:9 antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.



CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

*One Step test to detect Yersinia enterocolitica O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Yersinia enterocolitica O:3 y O:9 en formato cassette*

If the sample is negative, there is no *Y. enterocolitica* O:3 and O:9 presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-*Y. enterocolitica* antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control green-conjugate complex and both control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provided in the kit are approved for use in the CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

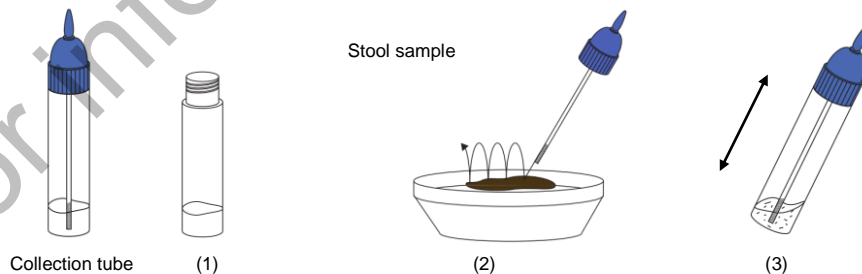
SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 1-2 days prior to testing. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2), to collect faecal sample (approx. 125mg) and add it to the collection tube. For liquid samples, add approx. 125µL in the collection tube using a micropipette.
2. Close the collection tube with the diluent and stool sample. Shake the collection tube in order to assure good sample dispersion (3).

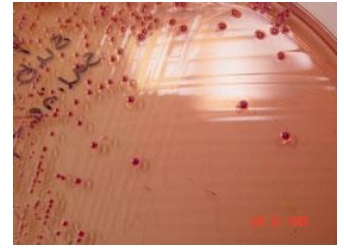


CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

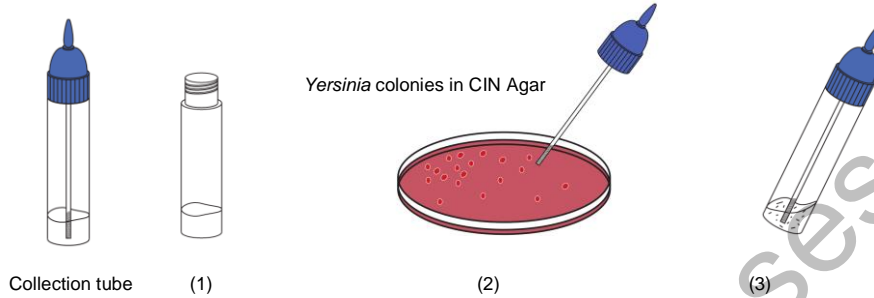
Suspected *Yersinia* colonies in stool culture

The CIN media (faecal culture) is the method of choice for the isolation of *Yersinia* spp. (aerobes, 48 hours/30°C). After incubation in CIN Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar) the typical *Yersinia enterocolitica* colonies will have deep-red centres surrounded by a transparent, pale border giving the appearance of a "bull's-eye".



Yersinia colonies in CIN Agar

1. Examine CIN plates after 1 day incubation. Select small (1-2mm diameter) colonies having deep red centre with sharp border surrounded by clear colourless zone with entire edge. Take out the cap of the collection tube (1). Use the stick or an inoculating needle to pick up 3 or 4 suspected *Yersinia* colonies (2) and add them to the collection tube.
2. Close the collection tube with the diluent and suspected colonies. Shake the collection tube in order to assure good sample dispersion (3).



Note: After 42 to 48 hours of incubation, the colonies are often completely pink.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card tests
- Instructions for use
- Collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

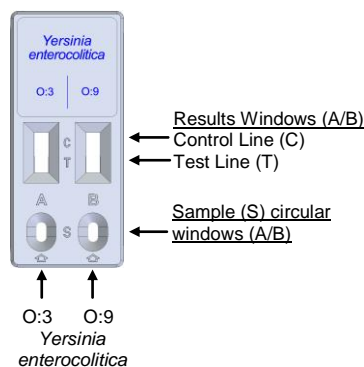
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer
- CIN media (Agar)

TEST PROCEDURE

Allow tests, samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the collection tube, cut the end of the cap (4) and dispense 4 drops in the circular window marked with the letter A (5) and 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.

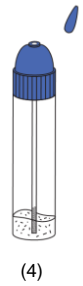


CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

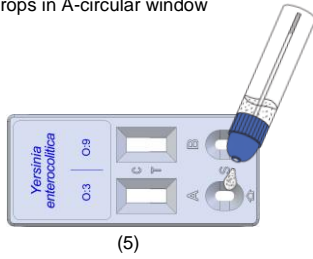
One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
 Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

Yersinia enterocolitica O:3 Strip A-procedure

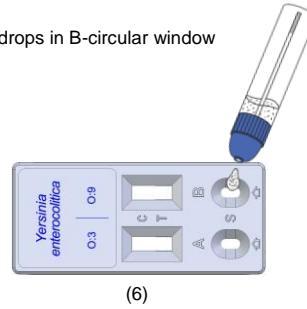
Yersinia enterocolitica O:9 Strip B-procedure



Add 4 drops in A-circular window



Add 4 drops in B-circular window



INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)

- A: Green → Negative *Y. enterocolitica* O:3
 B: Green → Negative *Y. enterocolitica* O:9
- A: Green/Red → Positive *Y. enterocolitica* O:3
 B: Green/Red → Positive *Y. enterocolitica* O:9
- A: Green/Red → Positive *Y. enterocolitica* O:3
 B: Green → Negative *Y. enterocolitica* O:9
- A: Green → Negative *Y. enterocolitica* O:3
 B: Green/Red → Positive *Y. enterocolitica* O:9

INVALID RESULTS

-

	A (<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3)	B (<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9)	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	There is no <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 and/or <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 presence.
2.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	There is <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 and <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 presence.
3.	+ GREEN-RED	- GREEN	There is <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 presence.
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	There is <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 presence.
5.	Any other result	Any other result	Invalid result either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

Simultaneous infections caused by both serotypes are not frequent.

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.



CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high antigens concentration to faint when the antigens concentration is close to the detection limit value of the test.
4. CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
5. Positive results determine the presence of *Yersinia enterocolitica* O:3 and/or *Yersinia enterocolitica* O:9 in faecal samples; nevertheless, a positive result should be followed up with additional laboratory techniques (biochemical and serological methods or by PCR) to confirm the results. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.
6. A negative result is not meaningful because of it is possible the antigens concentration in the stool sample is lower than the detection limit values. If the symptoms or situation persist, a *Yersinia enterocolitica* determination should be carried out on a sample from an enrichment culture.

EXPECTED VALUES

In Europe and the United States, most of the human pathogenic *Y. enterocolitica* strains are classified as biotype 4, serotype O:3. After campylobacteriosis and salmonellosis, yersiniosis ranks third among the notifiable bacterial zoonoses in the EU.

Y. enterocolitica is a relatively infrequent cause of diarrhea and abdominal pain. Based on data from the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), which measures the burden and sources of specific diseases over time, approximately one culture-confirmed *Y. enterocolitica* infection per 100,000 persons occurs each year. Children are infected more often than adults, and the infection is more common in winter.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity (detection limit)

Detection limit values of CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 are: 3×10^5 CFU/mL for *Y. enterocolitica* O:3 and 2×10^7 CFU/mL for *Y. enterocolitica* O:9.

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9, CerTest) and another commercial available agglutination test (*Yersinia enterocolitica* Agglutination Kit, Progen). The results were as follows:

		AG test: <i>Yersinia enterocolitica</i> Agglutination Kit		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3+O:9 (<i>Y. enterocolitica</i> O:3)	+	7	0	7
	-	0	56	56
	Total	7	56	63

		AG test: <i>Yersinia enterocolitica</i> Agglutination Kit		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3+O:9 (<i>Y. enterocolitica</i> O:9)	+	2	0	2
	-	0	61	61
	Total	2	61	63





CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3+O:9 vs <i>Yersinia enterocolitica</i> Agglutination Kit	>99%	>99%	>99%	>99%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 using CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens occasionally present in faeces:

<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

For information purposes only



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Yersinia enterocolitica* serotipos O:3 y O:9 en muestras de heces y de colonias sospechosas de *Yersinia* en coprocultivo.

CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por *Yersinia enterocolitica* O:3 y/o *Yersinia enterocolitica* O:9 y podría ser utilizado para el serotipado de aislados sospechosos de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 a partir de un medio selectivo (coprocultivo).

INTRODUCCIÓN

Yersinia enterocolitica (*Y. enterocolitica*), especie anaeróbica facultativa, gram-negativa y oxidasa negativa, es altamente heterogénea y puede clasificarse dentro de varios bioserotipos, de los cuales sólo unos pocos han sido asociados con enfermedad en humanos. Se han descrito seis diferentes biotipos (biotipo 1A, 1B, 2-5) y numerosos serotipos de *Y. enterocolitica*. Once de esos serotipos se han asociado con mayor frecuencia con infecciones en humanos. La mayoría de las cepas de *Y. enterocolitica* que se asocian con la yersiniosis humana pertenecen a los bioserotipos 1B/O:8, 2/O:5,27, 2/O:9, 3/O:3 y 4/O:3.

Yersinia enterocolitica es un patógeno muy común tanto en humanos como en animales. La infección provocada por *Y. enterocolitica* puede provocar, dependiendo de la edad de la persona infectada, gran variedad de síntomas. El síntoma clínico predominante es dolor abdominal y diarrea con o sin presencia de fiebre. Existen otras complicaciones como artritis y eritema nodoso. A menudo esta infección por *Y. enterocolitica* ocurre en niños pequeños. Los síntomas más comunes son fiebre, dolor abdominal y diarrea, a menudo sanguinolenta. Estos síntomas se desarrollan entre 4 y 7 días tras exposición y pueden durar hasta 1 o 3 semanas o incluso más. Hay una evidencia indirecta de que los alimentos, particularmente productos derivados del cerdo, son la fuente más importante de la infección en humanos.

La epidemiología de las infecciones por *Y. enterocolitica* es compleja y no es fácil de entender. La mayoría de los casos de yersiniosis aparecen esporádicamente sin un origen aparente. *Y. enterocolitica* se sospecha que es un patógeno importante asociado a los alimentos, aunque pocas veces se ha podido aislar este patógeno a partir de los alimentos, excepto a partir de despojos o asaduras comestibles del cerdo. En estudios de casos control, se ha demostrado que existe una correlación entre el consumo de carne cruda o poco cocinada de cerdo y yersiniosis. Los genotipos de cepas de *Y. enterocolitica* encontrados en humanos, mantienen esta asociación entre yersiniosis y consumo de cerdo.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección de *Yersinia enterocolitica* serotipo O:3 y *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9 en muestras de heces y de colonias sospechosas de *Yersinia* en coprocultivo.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Yersinia enterocolitica* O:3 en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Yersinia enterocolitica* O:3) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Yersinia enterocolitica* O:9 en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Yersinia enterocolitica* O:9) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es *Y. enterocolitica* O:3 positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Y. enterocolitica* O:3-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es *Y. enterocolitica* O:9 positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Y. enterocolitica* O:9-microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-*Y. enterocolitica* O:3 presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-*Y. enterocolitica* O:9 presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de *Y. enterocolitica* O:3 y O:9 o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-*Y. enterocolitica* presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en ambas tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

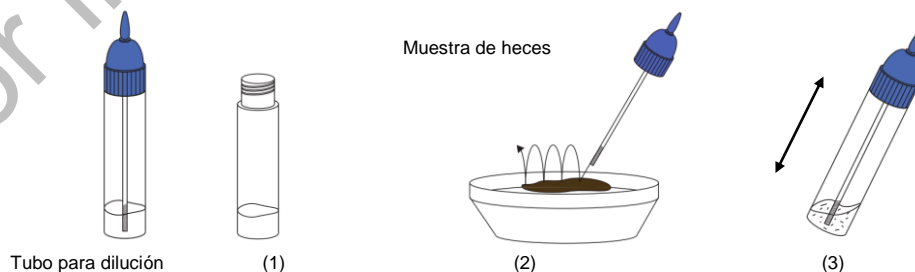
RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Muestras de heces

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se pueden conservar en frío (2-8°C), durante 1-2 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), tomando una cantidad de heces (aprox. 125mg) y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución. Para muestras líquidas, añada aprox. 125µL en el tubo para dilución utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).

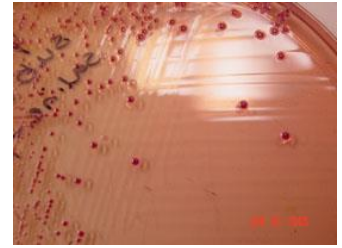


Colonias sospechosas de *Yersinia* en coprocultivo

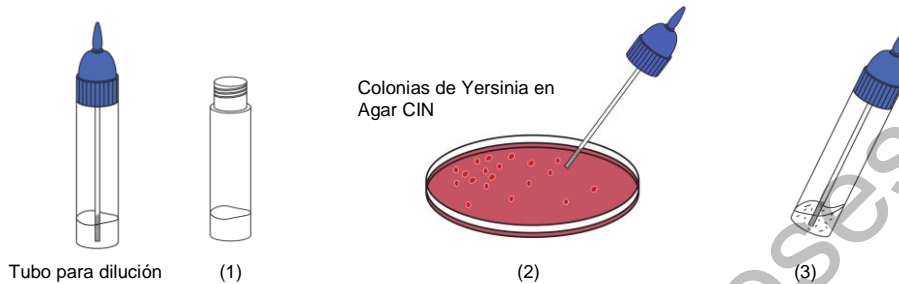
El medio CIN (para coprocultivo) es el método de elección para el aislamiento de *Yersinia spp.* (aerobio, 48horas/30°C). Tras incubación en Agar CIN (Agar Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) las típicas colonias de *Yersinia enterocolitica* aparecerán con el centro hundido de color rojo rodeadas de un borde claro-transparente dando la apariencia de un "ojo de buey".

1. Examinar las placas de CIN tras 1 día de incubación. Seleccionar colonias pequeñas (1-2mm de diámetro) con el centro rojo hundido y con el borde más claro, sin color, muy definido e intacto. Abrir el tubo para dilución (1). Usar el palito o una aguja de siembra para "picar" en 3 ó 4 colonias sospechosas de *Yersinia* (2) y añadir al tubo para dilución.

2. Cerrar el tubo con el diluyente y con las colonias sospechosas. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



Colonias de *Yersinia* en Agar CIN



Nota: Tras 42-48 horas de incubación, las colonias a menudo se vuelven completamente rosas.

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

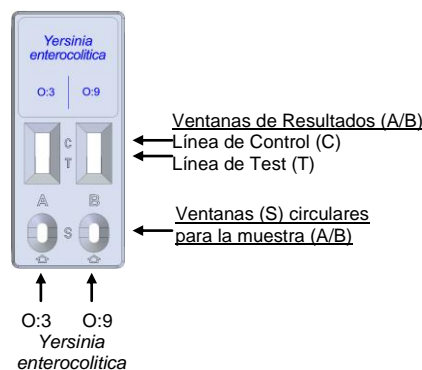
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro
- Medio CIN (Agar)

PROCEDIMIENTO

Previamente los tests, las muestras y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo para dilución para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución, cortar la punta del tapón (4) y añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), y añadir 4 gotas, con el mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (6), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.

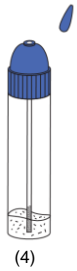


CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

Procedimiento para la tira A de *Y. enterocolitica* O:3

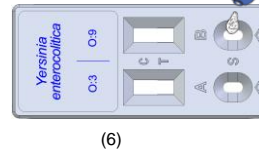
Procedimiento para la tira B de *Y. enterocolitica* O:9



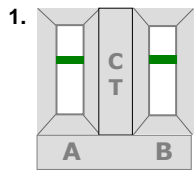
Añadir 4 gotas en la ventana circular (A)



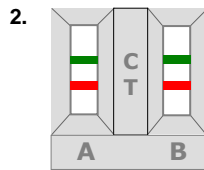
Añadir 4 gotas en la ventana circular (B)



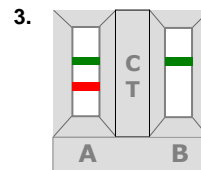
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



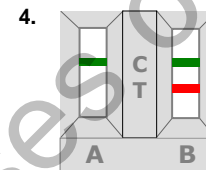
A: Verde → Negativo *Y. enterocolitica* O:3
B: Verde → Negativo *Y. enterocolitica* O:9



A: Verde/Rojo → Positivo *Y. enterocolitica* O:3
B: Verde/Rojo → Positivo *Y. enterocolitica* O:9

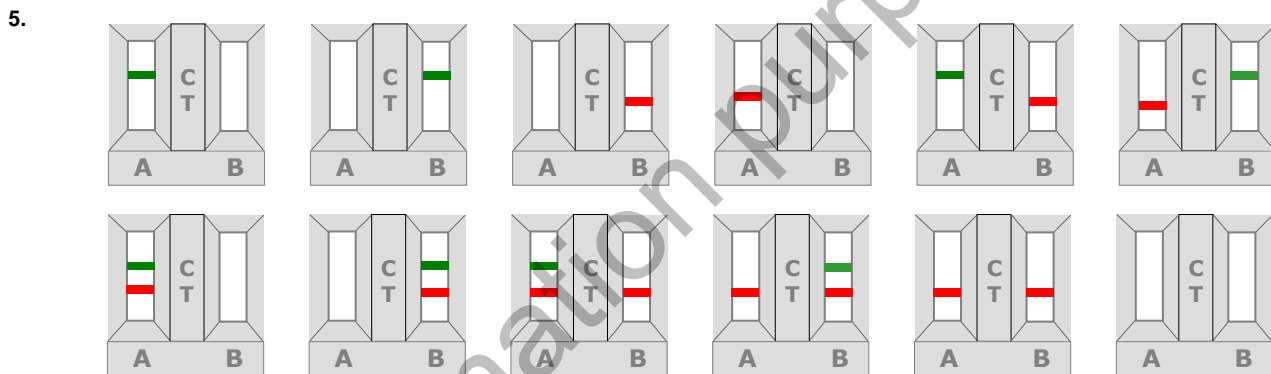


A: Verde/Rojo → Positivo *Y. enterocolitica* O:3
B: Verde → Negativo *Y. enterocolitica* O:9



A: Verde → Negativo *Y. enterocolitica* O:3
B: Verde/Rojo → Positivo *Y. enterocolitica* O:9

RESULTADOS INVÁLIDOS



	A (<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3)	B (<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9)	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No hay presencia de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 y/o <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9.
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 y <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9.
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Hay presencia de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3.
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9.
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido en A o en B: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

Las infecciones simultáneas causadas por ambos serotipos son poco frecuentes.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.



CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en la línea de test (T) en la ventana de resultados variará dependiendo de la concentración de antígenos presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
- Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de la línea del test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de antígenos a débil cuando la concentración de antígenos está cerca del valor del límite de detección.
- CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
- Los resultados positivos determinan la presencia de *Yersinia enterocolitica* O:3 y/o *Yersinia enterocolitica* O:9 en muestras de heces; sin embargo, un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio (métodos bioquímicos y serológicos o por PCR) para confirmar los resultados. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
- Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de heces sea inferior a los valores del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de *Yersinia enterocolitica* se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento.

VALORES ESPERADOS

En Europa y en los Estados Unidos, la mayoría de las cepas de *Y. enterocolitica* están clasificados dentro del biotipo 4, serotipo O:3. La yersiniosis es la tercera en el ranking de zoonosis bacterianas notificables en la Unión Europea tras campilobacteriosis y salmonelosis.

Y. enterocolitica no suele ser la causa más frecuente de diarrea y dolor abdominal. Según los datos de Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), los cuales miden la incidencia y origen de ciertas enfermedades específicas a lo largo del tiempo, aproximadamente se obtiene un cultivo confirmado por infección de *Y. enterocolitica* cada 100000 personas cada año. Los niños se infectan más a menudo que los adultos, y la infección es más frecuente durante el invierno.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica (límite de detección)

Los límites de detección de CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 son: 3×10^5 UFC/mL para *Y. enterocolitica* O:3 y 2×10^7 UFC/mL para *Y. enterocolitica* O:9.

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9, CerTest) y otro test comercializado de aglutinación (*Yersinia enterocolitica* Agglutination Kit, Progen). Los resultados se muestran a continuación:

		AG test: <i>Yersinia enterocolitica</i> Agglutination Kit		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3+O:9 (<i>Y. enterocolitica</i> O:3)	+	7	0	7
	-	0	56	56
	Total	7	56	63





CERTEST *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9

One Step test to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Yersinia enterocolitica* O:3 y O:9 en formato cassette

		AG test: <i>Yersinia enterocolitica</i> Agglutination Kit		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3+O:9 (<i>Y. enterocolitica</i> O:9)	+	2	0	2
	-	0	61	61
	Total	2	61	63

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3+O:9 vs <i>Yersinia enterocolitica</i> Agglutination Kit	>99%	>99%	>99%	>99%

Los resultados mostraron que CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9 presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Yersinia enterocolitica* serotipo O:3 y *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9.

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de CerTest *Yersinia enterocolitica* O:3+O:9; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces:

<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

- WEYNANTS V., et al. "Detection of *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:3 by a PCR Method". *Journal of clinical microbiology*, May 1996. p. 1224-1227, Vol. 34, No.5.
- FREDRIKSSON-AHOMAA M, et al. "Low occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem". *Clinical microbiology reviews*, Apr. 2003. p. 22-229, Vol. 16, No. 2.
- ROSNER B., et al. "Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008". *BMC Public Health*, 2010,10:337.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro	Keep dry Almacenar en lugar seco	Use by Fecha de caducidad	Manufacturer Fabricante	LOT Batch code Número de lote
Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	Temperature limitation Limitación de temperatura	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL Sample diluent Diluyente de muestra	REF Catalogue number Número de referencia



For information purposes only



For information purposes only



CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

