




Serazym® *H. pylori* 2nd Gen.

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Helicobacter pylori* Antigen in Stuhlproben

REF E-114-A  96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein gramnegatives, polar begeißeltes, mikroaerophiles Stäbchen, welches die Magenschleimhaut des Menschen besiedelt und dort lebenslang persistieren kann. Es wird geschätzt, dass etwa die Hälfte der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist, wobei die Prävalenz der Infektion in Abhängigkeit von der geografischen Region und sozioökonomischen Faktoren schwankt (1). Für die Verbreitung gelten oral-orale und fäkal-orale Übertragungswege als wahrscheinlich (2). Neben asymptomatischen Infektionsverläufen verursacht *H. pylori* bei ca. 10 % der Infizierten eine chronisch aktive Gastritis. Als Folgeerkrankungen können sich die gastroduodenale Ulcuskrankheit, das Adenokarzinom des Magens oder das MALT-Lymphom entwickeln (3). Die pathogenetische Bedeutung von *H. pylori* für die Entwicklung von Gastritiden und peptische Ulcera wurde erst durch die Arbeiten von Marshall und Warren 1984 erkannt und 2005 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (4). Die WHO hat 1994 das Bakterium *H. pylori* als Karzinogen der Klasse I eingestuft.

Die pathogene Wirksamkeit *H. pylori* spezifischer extrazellulärer Produkte, wie Urease, Vac A (vakuolisierendes Zytotoxin A) und Cag A (Cytotoxin, das durch das Cytotoxin-assoziierte Gen A kodiert und über den Typ IV Sekretionsapparat in die Wirtszelle geschleust wird), liegt in der direkten Epithelschädigung. Darüber hinaus verursacht die Infektion eine chronische Entzündungsreaktion unter Infiltration neutrophiler Granulozyten und verstärkter Bildung von Entzündungsmediatoren wie z.B. Interleukin 8 (5).

Für die Diagnostik stehen verschiedene invasive (Kultur, Histologie, Urease-Schnelltest, PCR aus endoskopisch entnommenem Biopsiematerial) und nicht-invasive (Harnstoff-Atemtest, Stuhl-Antigen-Test, Antikörpernachweis im Serum) Methoden zur Verfügung. Nach der „S2k-Leitlinie Helicobacter pylori und gastroduodenale Ulkuserkrankheit“ wird für die klinische Diagnostik einer *H. pylori* Infektion der Einsatz von Tests empfohlen, die den Nachweis einer aktuellen Infektion über den direkten

Erregernachweis oder dessen Stoffwechselprodukte ermöglichen: Histologie, Kultur, PCR, Stuhl-Antigen-Test, Urease-Test oder Harnstoff-Atemtest (3). Bei diesen Testmethoden kann es bei gastrointestinalen Blutungen oder Vorliegen eines Magen-Karzinoms oder bei vorangegangener Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren zu Störeinflüssen kommen, so dass in diesen Fällen der serologische Nachweis über spezifische Antikörper im Serum zu führen ist (3).

Für den direkten Nachweis von *H. pylori* Antigenen aus Stuhlproben haben sich ELISA Tests auf Basis monoklonaler Antikörper gegenüber polyklonalen Assays etabliert und werden von der aktuellen S2k-Leitlinie und den Fachverbänden empfohlen (3, 6).

Der *Serazym*[®] *H. pylori* 2nd Gen. verwendet hochspezifische monoklonale Antikörper für einen schnellen und spezifischen Nachweis einer Infektion mit *Helicobacter pylori*.

Literatur:

1. Pepleteiro B, Bastos A, Ferro A et al. (2014): Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systemic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci* 59: 1698-1709.
2. Lambert, J R, Lin S K, Sievert W, Nicholson L, Schembri M and Guest C (1995): High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *Am J Gastroenterol* 90: 2167-2171.
3. Fischbach W, et al. (2016): S2k-Leitlinie *Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit. *Z Gastroenterol* 54: 327-363.
4. Marshall B J, and Warren J R (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* 16: 1311-1314.
5. Graham D Y (2015): Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. *Helicobacter pylori* Update: Gastric Cancer, Reliable Therapy, and Possible Benefits. *Gastroenterology* 148: 719-731.
6. Gisbert J P, de la Morena P and Abraira V (2006): Accuracy of Monoclonal Stool Antigen Test for the Diagnosis of *H. pylori* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 101: 1921-1930.

Anwendungsbereich

Der *Serazym*[®] *H. pylori* 2nd Gen. ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum Nachweis von *Helicobacter pylori* Antigen in Stuhlproben.

Testprinzip

Der *Serazym*[®] *H. pylori* 2nd Gen. ist ein direkter Zwei-Seiten-Assay auf der Basis monoklonaler Antikörper gegen *Helicobacter pylori* Antigen. Verdünnte, unbehandelte Stuhlproben sowie negative und positive Kontrollproben werden in die mit monoklonalen anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und Peroxidase (POD)-markierte monoklonale anti-*Helicobacter pylori*-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach erneuter Inkubation und einem weiteren Waschschrift setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach der Inkubation durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm/ \geq 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration des spezifisch gebundenen *Helicobacter pylori*-Antigens direkt proportional.

Testkomponenten

		Für 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit monoklonalen anti- <i>H. pylori</i> -Antikörpern (Maus)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung weinrot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positive Kontrolle <i>H. pylori</i> positive Probe (inaktiviert)	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle <i>H. pylori</i> negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte monoklonale anti- <i>H. pylori</i> -Antikörper (Maus)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt violette Kappe
7	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder eingefroren bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 Stunden bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Stuhlproben gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 500 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 100 mg (Durchmesser etwa 2 - 3 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 100 µl in das Probenverdünnungs-medium überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 100 mg oder 100 µl Stuhlprobe + 0,5 ml Verdünnungsmedium (3).

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren.
3. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
9. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
10. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln
11. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,10

Proben mit OD-Werten gleich dem oder oberhalb des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. zu bewerten.

Referenzwert

<i>Serazym</i> [®] H. pylori 2nd Gen.	
Positiv	≥ Cut-off
Negativ	< Cut-off

Aufgrund von Unterschieden im Einsender-Klientel wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenz-bereiche bestimmen sollte. Die genannten Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der negativen Kontrolle ≤ 0,20 (manuelle Abarbeitung)
≤ 0,30 (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der positiven Kontrolle ≥ 1,20

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

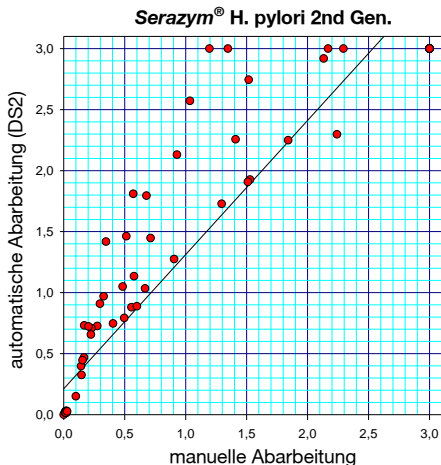
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Helicobacter pylori* Antigen in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile in zentrifugierten Proben können sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Ein negatives Ergebnis im *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. schließt eine Infektion nicht aus.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2 oder DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Erhöhung des max. zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Programmierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Im Rahmen der Untersuchung von 93 Stuhlproben wurde bei parallel durchgeführter manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,928$ ermittelt.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym® H. pylori 2nd Gen.* aus 24-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	2,377	0,126	5,3
2	0,871	0,065	7,4
3	0,124	0,014	11,0

Lot-to-Lot-Assay Variationskoeffizienten im *Serazym® H. pylori 2nd Gen.* in 3 unterschiedlichen Chargen und Testläufen aus 3-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	2,626	0,284	10,4
2	1,265	0,138	17,4
3	0,162	0,030	18,5

Inter-Assay Variationskoeffizienten im *Serazym® H. pylori 2nd Gen.* in 10 unterschiedlichen Testläufen aus 3-fach Bestimmungen von Proben:

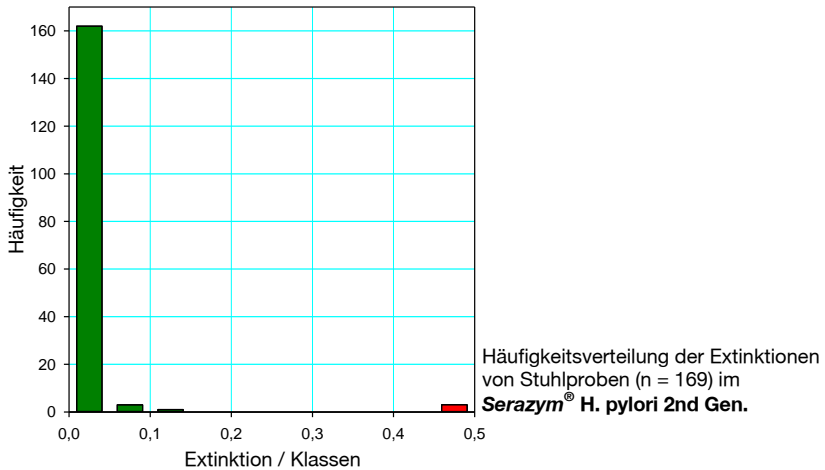
Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	2,483	0,157	6,3
2	1,044	0,138	13,2
3	0,142	0,015	10,3

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze des *Serazym® H. pylori 2nd Gen.* wurde durch Titration von mit gereinigtem *H. pylori* Lysatantigen aufgestockten negativen Stuhlproben mit $< 31,3$ ng/ml bestimmt.

Festlegung des Grenzwertes

Auf der Basis der Extinktionsverteilung von 169 Stuhlproben wurde der Grenzwert im *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. auf Extinktion Negative Kontrolle + 0,1 festgesetzt.



Spezifität und Sensitivität

Spezifität und Sensitivität des *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. wurden im Rahmen einer retrospektiven Studie im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt.

	Vergleichs ELISA positiv	Vergleichs ELISA negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	140	6**
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	2*	85

Spezifität: 93,4% Sensitivität: 98,6%

Die mit * und ** gekennzeichneten Proben wurden in einem kommerziell erhältlichen Lateral Flow Assay nachuntersucht. Daraus ergibt sich eine korrigierte Spezifität von 97,7% und eine korrigierte Sensitivität von 99,3%.

Kreuzreaktivität

Folgende Mikroorganismen wurden mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml in Verdünnungsmedium getestet und im *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. als negativ bewertet (OD 450 / 620nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC (7966)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC (11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC (6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC (25285)
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC (8090)
<i>Clostridium sordelli</i>	ATCC (9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC (13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC (13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC (29212)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25922)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC (13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC (27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC (8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (10145)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC (14028)
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus/enteritidis</i>	ATCC (13076)
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC (12022)
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC (25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC (17802)
<i>Candida albicans</i>	ATCC (10231)

<i>Campylobacter coli</i>	ATCC (33559)
<i>Campylobacter jejunii</i>	ATCC (32291)
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC (27374)
<i>campylobacter upsaliensis</i>	ATCC (43954)
<i>Campylobacter lari</i>	ATCC (35221)
<i>Vibrio cholerae</i>	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:3	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> Y11	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> RKI 0803733	klinisches Isolat
<i>Clostridium difficile</i>	VPI 10463
<i>Salmonella infantis</i>	ATCC (51741)
<i>Salmonella anatum</i>	ATCC (9270)
<i>Salmonella paratyphi</i> A	ATCC (11511)
<i>Salmonella paratyphi</i> B	ATCC (8759)
<i>Salmonella paratyphi</i> C	Nr. 2 Pasteur
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM (20481)
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC (29906)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC (13525)
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC (49128)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC (13813)
<i>Morganella morganii</i>	ATCC (25830)

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu *H. pylori* positiven und negativen Stuhlproben keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf 100 mg Stuhlprobe.:

(-)-Scopolamine N-butyl bromid (0,5%, Buscopan[®]), Bariumsulfat (5%), Bismuth(III) subsalicylate (0,5%, Pepto-Bismol), Cyclamat (5%), Diclofenac (0,5%), Hämoglobin human (5%), Blut human (5%), Hylak[®] N (5%), Iberogast[®] (5%), Immodium[®] akut duo (0,03/1,9%), Loperamid hydrochloride (5%, Loperamid-CT akut), Metronidazol (0,5%), Mucin (5%), Nexium[®] (0,03%), Nifuroxazide (0,5%, Pentofuryl[®]), Palmitinsäure (20%), Perenterol forte (0,5%), Rennie[®] (20%), Simagel[®] (1%), Stearinsäure (20%), Vancomycin (0,5%)

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und die Stopplösung können darüber hinaus Parameter-übergreifend für die *Serazym*[®] Stuhlteste Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) und Giardia (E-106) eingesetzt werden.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!







Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2021-02-25	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie"

Inkubationsschema *Serazym*[®] *H. pylori* 2nd Gen. (E-114)

1.  100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
2.  3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
3.  3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur, lichtgeschützt)
4.  3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / \geq 620 nm



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis



Charge



Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



In-vitro- Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] *H. pylori* 2nd Gen.

Enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in faecal samples

REF E-114-A  96  *In-vitro*-diagnostic medical device 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

The human pathogen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a gram-negative microaerophilic bacterium that colonizes the gastric mucosa of humans with lifelong persistence. It is estimated that about 50 % of the world population is infected with *H. pylori* with varying prevalences in dependence of the geographic region and socio-economic factors (1). Infection via oral-oral or fecal-oral route is assumed as the most likely mode of transmission (2). Besides asymptomatic infections, *H. pylori* causes chronic active gastritis in about 10 % of infected persons. Gastroduodenal ulcer, gastric adenocarcinoma or MALT Lymphoma may arise as secondary complications (3). The pathogenic significance of *H. pylori* for the development of gastritis and peptic ulcer has only been realized by the research of Warren and Marshall in 1984, which has been awarded with the Nobel Prize in 2005 (4). The WHO has even classified *H. pylori* as a class I pathogen.

The pathogenic effectiveness of *H. pylori* specific extra cellular products like Urease, Vac A (vacuolating cytotoxin A), and Cag A (cytotoxin coded by the cytotoxin associated gen A and injected into the host cell by the type IV secretion apparatus) is based on direct epithel cell damage. Additionally, the infection causes a chronic inflammation with granulocyte infiltration and increased production of inflammatory mediators like Interleucin 8 (5).

Different invasive (culture, histology, urease rapid test, PCR from biopsy material) and non-invasive (urea breath test, stool antigen test, antibody detection in serum) diagnostic methods are available. The "S2k-Leitlinie Helicobacter pylori und gastroduodenale Ulkuskrankheit" recommends to perform tests which detect an actual *H. pylori* infection by direct detection of the pathogen or its metabolites, e.g. histology, culture, PCR, stool antigen test, urease test or urea breath test (3). In the case of gastrointestinal bleedings, gastric cancer or after therapy with proton pump inhibitors, these methods may be impaired and serological antibody detection is the method of choice (3).

For direct antigen detection from stool specimens, ELISA tests based on monoclonal antibodies have been established and are preferable to polyclonal assays (3, 6).

Serazym[®] H. pylori 2nd Gen. uses highly specific monoclonal antibodies for rapid and specific detection of an infection with *Helicobacter pylori*.

References:

1. Pepleteiro B, Bastos A, Ferro A et al. (2014): Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systemic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci* 59: 1698-1709.
2. Lambert, J R, Lin S K, Sievert W, Nicholson L, Schembri M and Guest C (1995): High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *Am J Gastroenterol* 90: 2167-2171.
3. Fischbach W, et al. (2016): S2k-Leitlinie *Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit. *Z Gastroenterol* 54: 327-363.
4. Marshall B J, and Warren J R (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* 16: 1311-1314.
5. Graham D Y (2015): Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. *Helicobacter pylori* Update: Gastric Cancer, Reliable Therapy, and Possible Benefits. *Gastroenterology* 148: 719-731.
6. Gisbert J P, de la Morena P and Abraira V (2006): Accuracy of Monoclonal Stool Antigen Test for the Diagnosis of H. pylori Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 101: 1921-1930.

Intended Use

The *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of *Helicobacter pylori* antigen in faecal samples.

Principle Of The Test

Serazym[®] H. pylori 2nd Gen. is an indirect two-site-immunoassay for the qualitative determination of *Helicobacter pylori* antigen based on monoclonal antibodies.

Within the first incubation step (60 min, room temperature) diluted stool specimens as well as positive and negative controls react with the solid-phase adsorbed monoclonal antibodies. Unbound components are removed by a subsequent washing step. Within the second incubation step (30 min, room temperature) solid-phase bound immune complexes react with the horseradish (HRP)-labelled monoclonal antibodies of the conjugate. Unbound reagents are separated from the solid-phase antibody-antigen-antibody immune complexes by a further washing step. HRP converts the subsequently added colourless chromogenic substrate solution into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells after 10 min incubation at room temperature turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) of the solution read at 450 / \geq 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of *Helicobacter pylori* antigen. Referring to the cut-off value results are interpreted as positive or negative.

Test Components

		For 96 Wells	
1	WELLS	Microtitration plate coated with monoclonal anti- <i>H. pylori</i> antibodies (mouse)	12 single breakable 8-well strips colour coding wine red vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold	100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent	100 ml · ready to use coloured yellow black cap
4	CONTROL +	Positive control <i>H. pylori</i> antigen positive sample (inactivated)	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control <i>H. pylori</i> antigen negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled monoclonal anti- <i>H. pylori</i> antibodies (mouse)	15 ml · ready to use coloured green violet cap
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid	15 ml · ready to use yellow cap

Preparation And Storage Of Samples

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 hours. Longer storage is possible at -20°C. Repeated (> 3x) freezing and thawing of samples should be avoided. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 72 h at 2...8°C before testing in the ELISA.

Preparation

Mix samples thoroughly. Pipette 500 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 100 mg (diameter about 2 - 3 mm) of faeces if solid or pipette 100 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. Spin down floating particles in a micro centrifuge at maximum speed for 1 min if necessary.

Materials Required But Not Provided

Micropipettes · multi-channel pipette or multi-pipette · Reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer · microplate reader with 450 nm filter for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation

Preparation And Storage Of Reagents

Kit size and expiry

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

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay Procedure

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6, e.g. 100 mg or 100 µl faeces + 0.5 ml sample diluent (3).

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash solution in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid direct light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted sample**.
3. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. 3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well.
6. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. 3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
9. Incubate for 10 min at RT protected from light.
10. 3 drops (or 100 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
11. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result Interpretation

Qualitative evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.10

Samples with OD values equal with or higher than the cut-off are considered positive, samples with OD values below the cut-off are considered negative for *Helicobacter pylori* antigen.

Reference Values

Serazym® H. pylori 2nd Gen.	
Positive	≥ Cut-off
Negative	< Cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the negative control is ≤ 0.20 (manual performance)
≤ 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is ≥ 1.20

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps, mixing after addition of controls and samples to the biotin-conjugate in the first incubation step etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

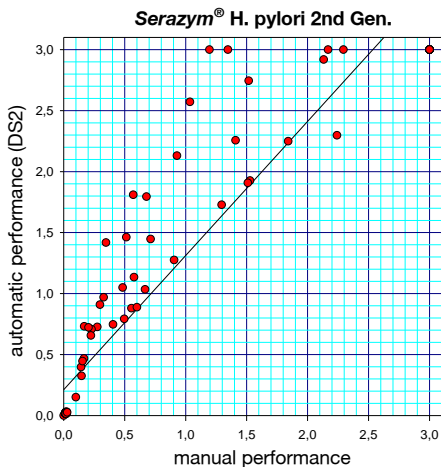
There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbances of the samples with that of the positive control. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false negative as well as false positive results. A negative test result in the *Serazym® H. pylori 2nd Gen.* does not exclude an infection.

Automatic Processing

Performing the *Serazym® H. pylori 2nd Gen.* on fully automated microplate processors (e.g. DS2 or DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control. It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x - 8x.

Correlation: manual – automatic processing

A panel of 93 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.928$.



Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym®* H. pylori 2nd Gen. calculated from 24-fold determinations of samples:

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	2.377	0.126	5.3
2	0.871	0.065	7.4
3	0.124	0.014	11.0

Lot-to-Lot-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym®* H. pylori 2nd Gen. in 3 different batches and test runs with 3-fold determinations of samples:

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	2.626	0.284	10.4
2	1.265	0.138	17.4
3	0.162	0.030	18.5

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym®* H. pylori 2nd Gen. in 10 different test runs with 3-fold determinations of samples:

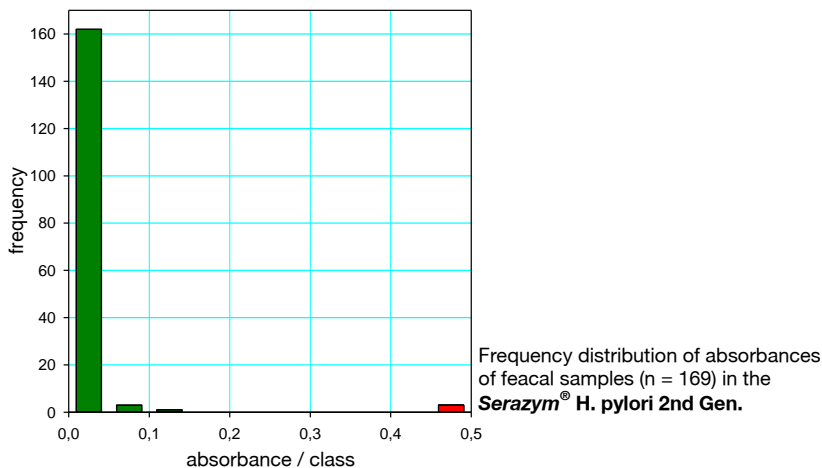
sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	2.483	0.157	6.3
2	1.044	0.138	13.2
3	0.142	0.015	10.3

Lower detection limit

The lower detection limit of the *Serazym®* H. pylori 2nd Gen. has been determined by titration of faecal samples spiked with purified *H. pylori* antigen. The lower detection limit is < 31.3 ng/ml.

Determination of the cut-off value

The frequency distribution of the absorbances of 169 faecal samples has been investigated in order to fix the cut-off value for the *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen.. The cut-off has been determined with absorbance negative control + 0.1.



Specificity and sensitivity

Specificity and sensitivity of the *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. have been determined in a retrospective study in comparison to another commercially available ELISA.

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	140	6**
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	2*	85

Specificity: 93.4% Sensitivity: 98.6%

The samples labeled with * and ** were re-tested in a commercial available Lateral Flow Assay. This results in a corrected specificity of 97.7% and a corrected sensitivity of 99.3%

Cross reactivity

The following microorganisms were diluted in sample diluent with $\geq 10^8$ colony forming units and tested negative with the *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC (7966)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC (11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC (6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC (25285)
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC (8090)
<i>Clostridium sordelli</i>	ATCC (9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC (13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC (13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC (29212)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25922)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC (13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC (27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC (8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (10145)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC (14028)
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus/enteritidis</i>	ATCC (13076)
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC (12022)
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC (25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC (17802)
<i>Candida albicans</i>	ATCC (10231)

<i>Campylobacter coli</i>	ATCC (33559)
<i>Campylobacter jejunii</i>	ATCC (32291)
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC (27374)
<i>campylobacter upsaliensis</i>	ATCC (43954)
<i>Campylobacter lari</i>	ATCC (35221)
<i>Vibrio cholerae</i>	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> Y11	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> RKI 0803733	clinical isolate
<i>Clostridium difficile</i>	VPI 10463
<i>Salmonella infantis</i>	ATCC (51741)
<i>Salmonella anatum</i>	ATCC (9270)
<i>Salmonella paratyphi</i> A	ATCC (11511)
<i>Salmonella paratyphi</i> B	ATCC (8759)
<i>Salmonella paratyphi</i> C	Nr. 2 Pasteur
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM (20481)
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC (29906)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC (13525)
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC (49128)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC (13813)
<i>Morganella morganii</i>	ATCC (25830)

Interference

None of the following substances added to *H. pylori* positive and negative stool samples showed a significant impact on the test result: The mentioned concentrations refer to 100 mg faeces.

(-)-Scopolamine N-butyl bromid (0.5%, Buscopan[®]), Barium sulfate (5%), Bismuth(III) subsalicylate (0.5%, Pepto-Bismol), Cyclamat (5%), Diclofenac (0.5%), Hemoglobin human (5%), Blood human (5%), Hylak[®] N (5%), Iberogast[®] (5%), Immodium[®] akut duo (0.03/1.9%), Loperamid hydrochloride (5%, Loperamid-CT akut), Metronidazole (0.5%), Mucin (5%), Nexium[®] (0.03%), Nifuroxazide (0.5%, Pentofuryl[®]), Palmitic acid (20%), Perenterol forte (0.5%), Rennie[®] (20%), Simigel[®] (1%), Stearic acid (20%), Vancomycin (0.5%)

Common Advices And Precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution are universally applicable for the *Serazym*[®] stool ELISA Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) and Giardia (E-106).

Do not use reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C before use. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!







Note safety precautions of the single test components!







History Of Changes


Version	Section	Modifications
2021-02-25	Common Advices and Precautions	Update
	History of Changes	Adding section "History of Changes"
	Intended use	Correction

Incubation Scheme *Serazym*[®] H. pylori 2nd Gen. (E-114)











1.  pipette
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **diluted stool sample**
 60 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution

2.  3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 30 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution

3.  3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min incubation (room temperature) protected from light

4.  3 drops (or 100 µl) **STOP** (8)

Read OD at 450 / ≥ 620 nm

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