

Seraline[®] Anti-Helicobacter-6 IgG Seraline[®] Anti-Helicobacter-6 IgA

Line Immunoassay zum Nachweis von IgG oder IgA Antikörpern gegen *Helicobacter pylori*
in humanem Serum oder Plasma

 LIA-007-6 G  20  *In-vitro*-Diagnostikum 
 LIA-007-6 A  20  *In-vitro*-Diagnostikum 



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

Einführung

Das humanpathogene Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein gramnegatives, bewegliches, spiralförmiges Stäbchen. Es wird geschätzt, dass etwa die Hälfte der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist, wobei die Infektionsrate in Ländern mit vergleichsweise niedrigem hygienischem Standard bereits im Kindesalter (< 10 Jahre) bei über 70% und in Ländern mit höherem hygienischem Standard bei 25 - 50% liegt. Für die Verbreitung gelten iatrogene, oral-orale und fäkal-orale Übertragungswege als gesichert. Das Vorkommen tierischer Erregerreservoirs konnte bislang nicht eindeutig belegt werden (1).

H. pylori ist durch eine starke Ureaseaktivität und bei einigen Stämmen vom Typ I durch die Produktion der Toxine VacA (vakuolisierendes Cytotoxin) und CagA (Cytotoxin-assoziiertes Antigen) charakterisiert (2, 3). In weiterführenden Studien (4, 5) wurden die Proteine HcpC (zysteinreiches *Helicobacter* Protein C) und GroEL (Chaperon) als zusätzlich relevante Virulenzfaktoren eingestuft, wobei GroEL eine höhere Wertigkeit zugeschrieben wird (5).

Die pathogenetische Bedeutung dieser extrazellulären Produkte liegt in der direkten Epithelschädigung. Darüber hinaus verursacht die Infektion eine chronische Entzündungsreaktion unter verstärkter Bildung von Entzündungsmediatoren wie Interleukin 8 und 1, sowie Tumornekrosefaktor alpha. Den bei *H. pylori* Infizierten häufig nachweisbaren Autoantikörpern gegen Parietalzellen wird eine mögliche Rolle bei der Entwicklung der atrophischen Gastritis als Vorstufe des Magenkarzinoms zugeschrieben (1, 6).

Die primär meist asymptomatisch verlaufende Infektion führt bei etwa 10% der Infizierten zur Ausprägung von *H. pylori* assoziierten Gastritiden, die Folgeerkrankungen wie chronisch-aktive Gastritis, Ulcus ventriculi, Ulcus duodeni, Magenkarzinom sowie MALT-Lymphom nach sich ziehen

können. Patienten mit Magenmalignomen und Ulcus duodeni sind zu fast 100% mit *H. pylori* infiziert, Patienten mit chronischer Gastritis zu 80% und mit Ulcus ventriculi zu 70%. Beim Magenkarzinom liegt in 60% der Fälle eine Infektion mit *H. pylori* vor (6).

Der Nachweis einer *H. pylori* Infektion kann durch invasive oder nicht invasive Methoden erfolgen. Bei den invasiven Methoden steht die endoskopische Probenentnahme allen Untersuchungen voran. Mit dem entnommenen Biopsiematerial können folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Histologie
- Urease Schnelltest
- Kultur
- Molekularbiologische Testungen (PCR zum Nachweis des Erregers oder von resistenzassoziierten Mutationen des Erregers)

In der Routinediagnostik haben sich mittlerweile die nicht invasiven Methoden etabliert. Der am häufigsten verwendete Nachweis ist der ¹³C Harnstoff-Atemtest, der sich durch eine einfache Handhabung und eine hohe Genauigkeit auszeichnet. Dieser Test hat zwar den Vorteil einer hohen Spezifität und Sensitivität, ist aber an spezielle Messgeräte und die Einnahme radioaktiv markierter Substanzen durch den Patienten gebunden.

Inzwischen stehen auch immunologische Stuhltests auf der Basis spezifischer anti- *Helicobacter pylori* Antikörper (mono- oder polyklonale AK) zur Verfügung, die den direkten Nachweis von *H. pylori* Antigenen aus Kotproben ermöglichen und zur therapeutischen Verlaufskontrolle eingesetzt werden können.

Der serologische Antikörpernachweis mittels Enzymimmunoassay (EIA) stellt die dritte nicht invasive Methode dar. Die Serologie steht den anderen Nachweismethoden bezüglich Sensitivität und Spezifität in nichts nach. In den Richtlinien zur Handhabung von *Helicobacter pylori* Infektionen (7) wurde hervorgehoben, dass der serologische Nachweis die einzige Methode ist, die unter der Einnahme von Protonenpumpenhemmern (PPI) verlässliche Ergebnisse liefert.

Der *Seraline*[®] Anti-*Helicobacter*-6 IgG und der *Seraline*[®] Anti-*Helicobacter*-6 IgA Test sollen in erster Linie als Bestätigungstests für positive und auffällige ELISA Ergebnisse dienen und eine Kategorisierung (Typ I oder Typ II) ermöglichen.

Prinzipiell haben sowohl die invasiven als auch die nicht invasiven Methoden Schwachstellen im Nachweis des *Helicobacter pylori* Bakterium. Um diese Unzulänglichkeiten zu minimieren wird in der S3 –Leitlinie (8) für eine zuverlässige Diagnostik empfohlen, dass 2 positive Testergebnisse oder eine positive Kultur vorliegen sollten, bevor eine Therapieentscheidung getroffen werden kann.

Literatur:

1. Bruce E. Dunn, Hartley Cohen, and Martin J. Blaser: *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews, Oct 1997 p 720-741
2. Hocker M. and Hohenberger P.: *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. Lancet 2003;362:1231-3.
3. Huang JO., Zheng GF., Sumanac K., Irvine EJ., Hunt RH.: Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 2003;125:1636-44.
4. Gao L., Weck MN., Michel A., Pawlita M., Brenner H.: Association between chronic atrophic gastritis and serum antibodies to 15 *Helicobacter pylori* proteins measured by multiplex serology. Cancer Res 2009;69:2973-80
5. Gao L., Michel A., Weck MN., Arndt V., Pawlita M., Brenner H.: *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer Risk: Evaluation of 15 H. pylori proteins determined by novel multiplex serology. Cancer Res 2009;69:2973-80
6. H. Hahn, D. Falke, U.Ullmann (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage 1999
7. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.: Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut 2012;61:646-664
8. Fischbach W et al.: S3-Leitlinie "Helicobacter pylori und gastroduodenale Ulkuskrankheit" der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Gastroenterol 2009; 47:68-102

Anwendungsbereich

Der *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von IgG oder IgA Antikörpern gegen relevante Antigene von *Helicobacter pylori* in humanem Serum oder Plasma. Die spezifische Antigenauswahl ermöglicht eine Differenzierung der Infektion in Typ I oder Typ II.

Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten. Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1 : 101 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (anti-human-IgG, oder -IgA oder -IgM) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um. Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren. Alternativ können die Teststreifen mit der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (15 µl Probe und 1500 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt. Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2..8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

Testkomponenten

1	TESTSTR	Teststreifen inkl. Auswerteschablone	20 Streifen Farbcodierung: braun
2	WIB CONC 5x	Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach	70 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	CONJ HRP IgG CONJ HRP IgA	Anti-human IgG-POD-Konjugat oder Anti-human IgA-POD-Konjugat	35 ml gebrauchsfertig, IgG , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe IgA , violett gefärbt, transparente Flasche, violette Kappe
4	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	35 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	INCUTRAY	Inkubationswanne mit Deckel	2

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Messzylinder und Bechergläser
- Pipetten und Pipettenspitzen für 15 µl und 1500 µl
- Kunststoffpinzette
- Wipp-Schüttler
- Filterpapier
- Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **1,5 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **1,5 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

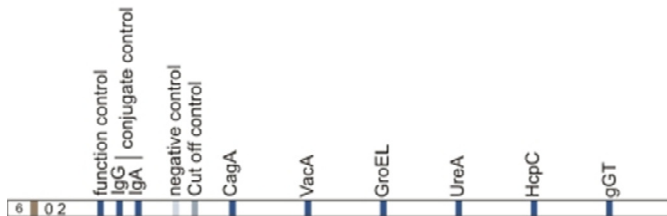
Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA sind untereinander 5 Kontrollbanden aufgetragen:

- Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
- Die Konjugatkontrollen IgG und IgA (positive Bande nur mit dem eingesetzten Konjugat IgG oder IgA).
Achtung: Die jeweils andere Konjugatkontrolle kann in Abhängigkeit von der Probe auch eine blasse, unspezifische Bande zeigen.
- Die Intensität der negativ-Kontrolle muss kleiner als die der Cut-off-Kontrolle sein.
- Die Cut-off-Kontrolle (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Banden als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle, die erwartete Konjugatkontrolle und die Cut-off-Kontrolle sichtbar sind.



Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Teststreifen können mit Hilfe der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden. Alternativ kann die Zuordnung der Banden mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchgeführt werden. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Bewertung	IgG / IgA
negativ	Farbintensität der Banden < Cut-off-Kontrolle
grenzwertig	1 Bande UreA, HcpC od. gGT \geq Cut-off-Kontrolle
positiv	CagA oder VacA oder GroEL \geq Cut-off-Kontrolle oder 2 Banden \geq Cut-off-Kontrolle

Verwendete Antigene

Antigen	Molekulargewicht	Vorkommen*
CagA	120-145kDa	Typ I (hoch virulent)
VacA	87-97kDa	Typ I (hoch virulent)
GroEL	54-62kDa	Typ II (virulent)
UreA	26kDa	Typ II
HcpC	28-32kDa	Typ II
gGT	59-61kDa	Typ II

* Stammtypisierung nur mit IgG Antikörper möglich

Leistungsmerkmale

Vergleichende Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der vergleichenden Sensitivität und Spezifität wurden Seren von Patienten mit Verdacht auf *Helicobacter pylori* Infektion und Blutspenderseren vergleichend im *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA und einem anderen kommerziellen Line Immunoassay untersucht.

IgG Nachweis (n =174)		<i>Seraline</i> [®] Anti-Helicobacter-6 IgG		
		positiv	grenzwertig	negativ
Vergleichs-Line-Immunoassay	positiv	96	0	3
	grenzwertig	0	1	0
	negativ	4	0	70

Übereinstimmung: 96,0%

Vergleichende Sensitivität: 97,0%

Vergleichende Spezifität: 94,6%

IgA Nachweis (n = 167)		<i>Seraline</i> [®] Anti-Helicobacter-6 IgA		
		positiv	grenzwertig	negativ
Vergleichs-Line-Immunoassay	positiv	50	1	4
	grenzwertig	1	6	0
	negativ	13	0	92

Übereinstimmung: 89,8%

Vergleichende Sensitivität: 93,5%

Vergleichende Spezifität: 87,6%

Durchseuchung

Ein Kollektiv von 400 Blutspenderseren wurde zur Ermittlung der Durchseuchungsrate im *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA untersucht. Von diesen Proben wurden 139 (131 positiv und 8 grenzwertig) im IgG-Nachweis und 78 (67 positiv und 11 grenzwertig) im IgA-Nachweis positiv bestimmt, was einer Prävalenz von 34,8% für IgG- und 19,5% für IgA-Antikörper entspricht.

n=400 Blutspender	<i>Seraline</i> [®] Anti-Helicobacter-6 IgG		<i>Seraline</i> [®] Anti-Helicobacter-6 IgA	
	Anzahl	%	Anzahl	%
positiv	131	32,8	67	16,8
grenzwertig	8	2	11	2,8
negativ	261	65,3	322	80,5

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen. Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** 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 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
2018-03-15	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung



Hersteller



Bestell-Nummer



Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten

Seraline[®] Anti-Helicobacter-6 IgG Seraline[®] Anti- Helicobacter-6 IgA

Line Immunoassay for detection of IgG or IgA antibodies to *Helicobacter pylori*
in human serum or plasma

 REF	LIA-007-6 G	 20	 IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum	 CE
 REF	LIA-007-6 A	 20	 IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum	 CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenthagener 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 spiral shaped bacterium that has been found in the stomachs of humans in all parts of the world. In developing countries, 70 to 90% of the population carries *H. pylori* mostly already acquired before the age of 10 years. In developed countries the prevalence of infection ranges from 25 to 50%. *H. pylori* infections are transmitted via the oral-oral, the faecal-oral route or iatrogenic. A substantial reservoir for *H. pylori* aside from the human stomach has not been confirmed so far (1).

H. pylori is characterized by a strong urease activity and some strains (type I) additionally produce toxins like VacA (vacuolating toxin) and CagA (cytotoxin-associated antigen A) (2, 3). Further studies have identified HcpC (Helicobacter cysteine-rich protein C) and GroEL (Chaperonin) as new independent virulence factors (4, 5), whereas GroEL is more important than HcpC.

These extracellular products contribute to the pathogenesis by direct damage of the gastric epithelium accompanied by a chronic inflammation with enhanced levels of inflammation mediators like interleukin 8, interleukin 1 or tumor necrosis factor alpha. Patients infected with *H. pylori* often develop autoantibodies to parietal cells. The key-role of these autoantibodies in the development of atrophic gastritis as precursor of gastric cancer has been reviewed (1, 6).

About 10% of the infected persons develop *H. pylori* associated gastritis and secondary diseases like chronic active gastritis, Ulcus ventriculi, Ulcus duodeni, gastric cancer and MALT lymphoma. Patients suffering from gastric malignomas and Ulcus duodeni are infected with *H. pylori* in nearly 100% of the cases. About 80% of patients with chronic gastritis, 70% of patients with Ulcus ventriculi and 60% of patients with gastric cancer are infected with *H. pylori* (6).

Diagnosis is usually based on gastroendoscopy combined with the detection of the pathogen in biopsy material by culture, histology, PCR or rapid urease test. Culture from biopsy material is difficult and not always successful. The ¹³C breath test which is often performed as follow up test, detects CO₂ released by the bacterial urease from radioactive labeled urea in patients breath. This method is not invasive but the need for special equipment and the uptake of radioactive urea by the patients are disadvantageous.

Immunological tests on the basis of specific anti-*H. pylori* antibodies (mono- or polyclonal) are available. They enable the direct detection of *H. pylori* antigens from faecal specimens and may be used for therapeutic surveillance.

Serology is the third method commonly used as a non-invasive method to diagnose *H. pylori* infection. Furthermore, serology is the only test that is not affected by local changes in the stomach that could lead to false-negative results in the other tests.

Invasive as well as non-invasive tests for detection of *H. pylori* infections contain methodological shortcomings. Therefore the S3 guidelines of the DGVS (8) recommend to include at least two positive test results or a positive culture to ensure a safe diagnosis and before initiating drug therapy.

References:

1. Bruce E. Dunn, Hartley Cohen, and Martin J. Blaser: *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews, Oct 1997 p 720-741
2. Hocker M. and Hohenberger P.: *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. Lancet 2003;362:1231-3.
3. Huang JO., Zheng GF., Sumanac K., Irvine EJ., Hunt RH.: Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 2003;125:1636-44.
4. Gao L., Weck MN., Michel A., Pawlita M., Brenner H.: Association between chronic atrophic gastritis and serum antibodies to 15 *Helicobacter pylori* proteins measured by multiplex serology. Cancer Res 2009;69:2973-80
5. Gao L., Michel A., Weck MN., Arndt V., Pawlita M., Brenner H.: *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer Risk: Evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology. Cancer Res 2009;69:2973-80
6. H. Hahn, D. Falke, U.Ullmann (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage 1999
7. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.: Management of *Helicobacter pylori* infection – the Masstricht IV/ Florence Consensus Report. Gut 2012;61:646-664
8. Fischbach W et al.: S3-Leitlinie “*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit” der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Gastroenterol 2009; 47:68-102

Intended use

The *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA is a Line Immunoassay (LIA) for detection of specific IgG or IgA antibodies against *Helicobacter pylori* in human serum or plasma samples.

Principle of the test

The antigens are plotted on nitrocellulose membranes and blocked to avoid unspecific reactions. After this procedure the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 101) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates. The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®]scan software.

Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 101 (15 µl sample and 1500 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Kit components

1	TESTSTR	test strips incl. evaluation template	20 strips colour coded: brown
2	WIB CONC 5x	wash and incubation buffer 5-fold	70 ml concentrate, transparent bottle, black cap
3	CONJ HRP IgG CONJ HRP IgA	anti-human IgG-HRP-conjugate or anti-human IgA-HRP-conjugate	35 ml , ready to use, IgG , coloured red, transparent bottle, red cap IgA , coloured purple, transparent bottle, purple cap
4	SUBSTR TMB	substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	35 ml , ready to use, black bottle, blue cap
5	INCUTRAY	incubation tray with cover	2

Materials required but not provided

- glassware
- pipettes and tips for 15 µl and 1500 µl
- plastic forceps
- rocking platform (vertical)
- filter paper
- collecting devices for infectious material
- distilled or deionized water

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 20 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

Working steps

1. Incubate the test strips with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **15 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **1.5 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **1.5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **1.5 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

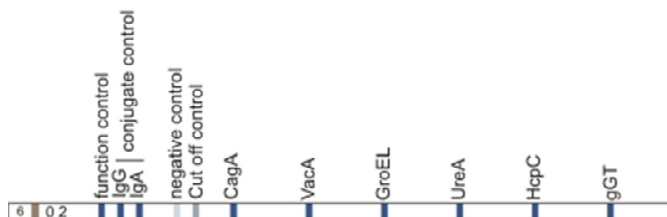
Test evaluation

Test validity

The *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *Seraline*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA test strips contain 5 consecutive control lines under the strip number:

- Function control (positive reaction with every sample).
- Conjugate controls IgG and IgA (positive reaction with the corresponding conjugate).
Note: The other conjugate control band may develop a weak, non-specific colour.
- The intensity of the negative control must be less than the Cut off control.
- Cut off control (band intensity is used for result evaluation of the diagnostic bands).

The test run is valid if the function control, the corresponding conjugate control and the Cut off control are clearly visible.



Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips. To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®] scan software. Judgement of the bands is performed according to the following classification:

Result interpretation	IgG / IgA
negative	all bands < Cut off control
borderline	1 band (UreA, HcpC or gGT) ≥ Cut off control
positive	CagA or VacA or GroEL ≥ Cut off control or 2 bands ≥ Cut off control

Used antigens

antigen	molecular weight	Incidence*
CagA	120-145kDa	type I (high virulent)
VacA	87-97kDa	type I (high virulent)
GroEL	54-62kDa	type II
UreA	26kDa	type II
HcpC	28-32kDa	type II
gGT	59-61kDa	type II

*strain typing only with IgG antibody detection

Performance characteristics

Comparative Sensitivity and Specificity

For the determination of the comparative sensitivity and specificity serum samples from patients suspected of an infection with *Helicobacter pylori* and blood donor samples were tested with the *Seraline*[®] Anti-*Helicobacter*-6 IgG / *Seraline*[®] Anti-*Helicobacter*-6 IgA and another commercial assay.

Detection of IgG (n = 174)		<i>Seraline</i> [®] Anti- <i>Helicobacter</i> -6 IgG		
		positive	borderline	negative
Commercial-Line-Immunoassay	positive	96	0	3
	borderline	0	1	0
	negative	4	0	70

Agreement: 96.0%

Comparative Sensitivity: 97.0%

Comparative Specificity: 94.6%

Detection of IgA (n = 167)		<i>Seraline</i> [®] Anti- <i>Helicobacter</i> -6 IgA		
		positive	borderline	negative
Commercial-Line-Immunoassay	positive	50	1	4
	borderline	1	6	0
	negative	13	0	92

Agreement: 89.8%

Comparative Sensitivity: 93.5%

Comparative Specificity: 87.6%

Prevalence

A population of 400 healthy blood donors was investigated to determine the prevalence of Anti-*Helicobacter* IgG and IgA antibodies by using the *Seraline*[®] Anti-*Helicobacter*-6 Line Immunoassays. Out of this population 139 (131 positive and 8 borderline) serum samples were determined positive for IgG and 78 (67 positive and 11 borderline) serum samples were determined positive for IgA antibodies, corresponding to a prevalence of 34.8% for IgG and 19.5% for IgA antibodies.

n=400 healthy blood donors	<i>Seraline</i> [®] Anti- <i>Helicobacter</i> -6 IgG		<i>Seraline</i> [®] Anti- <i>Helicobacter</i> -6 IgA	
	quantity	%	quantity	%
positive	131	32.8	67	16.8
borderline	8	2	11	2.8
negative	261	65.3	322	80.5

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. As in other Immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only. Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. 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. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8°C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2018-03-15	Common advices and precautions	Update



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use