

Instructions for Use

EULISA Helicobacter pylori IgA

Intended Use

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies
IgA against Helicobacter pylori

Micro titration 96 wells
Store kit at +2-8°C
For in vitro diagnostic use only



Document No. E-23-0231-02

March, 2015

EULISA Helicobacter pylori IgA

English: page 1
Deutsch: Seite 20

REF 211296

IVD



96

Contents

1. Introduction and background
2. Warnings and precautions
3. Principle of the test
4. Contents of the kit
5. Materials required but not supplied
6. Storage of the kit
7. Reagent and sample preparation / specimen requirements
8. Assay procedure
 - 8.1. Manual operation
 - 8.2. Dynex DS2 automated ELISA system
9. Evaluation and quality control
10. Interpretation of results / limitations of the procedure
11. Performance characteristics
 - 11.1. Standardisation
 - 11.2. Analytical specificity
 - 11.3. Detection limit (analytical sensitivity)
 - 11.4. Homogeneity of the solid phase
 - 11.5. Linearity
 - 11.6. Precision
 - 11.7. Frequency distribution of H. pylori-Ab (IgA)
 - 11.8. Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system
12. Warranty
13. Symbols
14. References
15. Summary flow chart

The product described herein has been manufactured in compliance with IVD directive 98/79/EG.

1. Introduction and background

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram-negative bacterium which infects gastric mucosa (1). This infection is associated with various gastroduodenal diseases like active chronic gastritis and gastric and duodenal ulcers (2). In addition, evidence has been accumulated that *H. pylori* infection increases the risk of gastric carcinoma (3). Serological testing for *H. pylori* antibodies is a well-established method for the diagnosis of this infection (4). Several antimicrobial regimens (antibiotics combined with bismuth) have been successfully used to eradicate the bacterium.

The present enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) is intended for the determination of IgA antibodies in human serum, directed against *H. pylori*. It may be used qualitatively for pre-endoscopy screening or quantitatively for therapy monitoring. The immobilised antigen is a purified extract from *H. pylori* ATCC-strain 43504, consisting of specific, native cell surface antigens, including the key antigen urease. Further, the preparation contains the Cag-A protein, coded by the cytotoxin-associated gene A, which is expressed only by the virulent strains of *H. pylori*.

The test is fast (incubation time 30 / 30 / 30 minutes) and flexible (divisible solid phase, ready-to-use reagents). Six calibrators allow quantitative measurements; a negative and a positive control check the assay performance.

2. Warnings and precautions

The test kit is intended for in vitro diagnostic use only; not for internal or external use in humans or animals.

Do not use reagents beyond their expiration dates. Adherence to the protocol is strongly recommended.

The sample buffer, calibrators and controls contain Na-azide as preservative. The wash buffer contains bromonitrodioxane and the conjugate methylisothiazolone / bromonitrodioxane as preservative. The substrate contains 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The stop solution, 0,2 M sulfuric acid (H₂SO₄), is acidic and corrosive.

The above mentioned reagents may be toxic if ingested. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals. Avoid all body contact, wear gloves and eye protection. If one of the reagents comes into contact with skin or

mucous membrane, wash thoroughly with water. Never pipette by mouth. Dispose in a manner complying with local/national regulations.

Na-Azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with a large amount of water to prevent azide build-up.

The calibrators and controls contain components of human origin. They have produced negative results when tested for Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, hepatitis B surface (HBs)-Ag, HIV 1/2-Ab and hepatitis C Virus (HCV)-Ab, in FDA-approved or European Directive 98/79/EG-compliant tests. However, no known test can guarantee that products derived from human blood will not be infectious. They should therefore be handled as if capable of transmitting infectious agents, and discarded appropriately. Please refer to CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) or other local/national guidelines on laboratory safety and decontamination procedures. Safety data sheet for all hazardous components contained in this kit is available on request from Euro Diagnostica.

3. Principle of the test

The wells of the solid phase are coated with selected *H. pylori* antigens. On this surface, the following immunological reactions take place:

1st reaction: *H. pylori*-specific antibodies present in the sample bind to the immobilised antigen, forming the antigen-antibody complex. Then, non-bound sample components are washed away from the solid phase.

2nd reaction: A second antibody, directed at human IgA antibodies and conjugated with horse-radish peroxidase (HRP), is added. This conjugate binds to the complex. Then, excess conjugate is washed away from the solid phase.

3rd reaction: The enzyme-labelled complex converts a colourless substrate into a blue product. The degree of colour development reflects the concentration of *H. pylori* antibodies (IgA) in the sample.

4. Contents of the kit

- a. 1 microwell plate, coated with selected H. pylori antigens and hermetically packed in a foil laminate pouch together with a desiccant bag. The plate consists of 12 strips, each of which can be broken into 8 individual wells.

MWP	12x8
------------	-------------

- b. Sample buffer, 100 mL, ready-to-use, orange coloured. Contains Tris-buffered saline (TBS), bovine serum albumin (BSA), Tween and Na-azide.

BUF	SPL
------------	------------

- c. Wash buffer, 100 mL, 10x-concentrate, blue coloured. Contains TBS, Tween and bromonitrodioxane.

BUF	WASH	10x
------------	-------------	------------

- d. 6 calibrators, 2,0 mL each, 0 - 3,0 - 10 - 30 - 100 and 300 U H. pylori antibodies (IgA) / mL, ready-to-use, gradually blue coloured. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

CAL	1-6
------------	------------

- e. Negative and positive control, 2,0 mL each, ready-to-use, green and red coloured, respectively. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

CONTROL	-
----------------	----------

CONTROL	+
----------------	----------

- f. Anti-human IgA HRP conjugate, 14 mL, ready-to-use, yellow coloured. Buffered solution containing stabilising protein, methylisothiazolone and bromonitrodioxane.

CONJ	IgA
-------------	------------

- g. Substrate solution, 14 mL, ready-to-use, colourless. Contains a buffered solution of TMB and H₂O₂. Contained in a vial impermeable to light.

SUBS	TMB
-------------	------------

- h. Stop solution (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, colourless, ready-to-use. Caution: sulfuric acid is corrosive.



- i. Directions for use
- j. Lot-specific certificate of analysis

5. Materials required but not supplied

- a. Deionised or distilled water
- b. Graduated cylinder, 1000 mL
- c. Tubes for sample dilution (transfer tubes in the microwell plate format recommended)
- d. Pipettes for 10, 100 and 1000 µL (1- and 8-channel pipettes recommended)
- e. Microwell plate washer (optional)
- f. Microwell plate photometer fitted with a 450 nm filter
- g. ELISA evaluation program (recommended)

6. Storage of the kit

Store kit at 2 - 8°C. It is stable up to the expiry date stated on the label of the box. Do not use kit beyond its expiry date.

7. Reagent and sample preparation / specimen requirements

Do not exchange or pool corresponding components from different kits, due to possibly different shipping or storage conditions.

- a. Before opening the pouch of the solid phase, it must have reached room temperature. Remove the supernumerary microwells from the frame and immediately put them back into the pouch, together with the desiccant bag. Reseal the pouch hermetically and keep it refrigerated for future use.
- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with 900 mL deionised water. Mix thoroughly. The diluted buffer is stable for several weeks if stored refrigerated (2 - 8°C).
- c. Preparation of the samples: Handle patient specimens as if capable of transmitting infectious agents. Prepare sera using normal laboratory techniques and dilute them 1/100, e.g. 10 µL serum + 990 µL sample buffer. Mix thoroughly.

For rapid dispensing during the assay procedure, preparation of the calibrators, controls and samples in microwell transfer tubes is recommended. This allows the operation of an 8-channel pipette during the assay procedure.

If samples are not assayed immediately, they should be stored at 2 - 8°C and assayed within 3 days. For longer storage, -20°C or lower temperature are recommended. Repeated freezing and thawing of sera should be avoided. Thawed samples must be mixed prior to diluting.

Specimen requirements: Highly lipemic, haemolysed or microbially contaminated sera may cause erroneous results and should be avoided.

8. Assay procedure

8.1. Manual operation

Before starting the assay, all components of the kit must have reached room temperature (23 ± 3°C).

To achieve best results, i.e. the maximum ratio between specific and background signal, **careful washing** is essential (steps a, c and e). It is **crucially important to remove the wash solution completely**. For that purpose, tap the plate firmly on several layers of absorbent tissue. Automated washers must be verified according to results obtained by manual washing.

- a. Immediately prior to use, wash the solid phase once: fill wells with 350 µL wash buffer each, soak for about 10 seconds in the wells and remove.

- b. Dispense the calibrators (2,0 mL each, ready-to-use, gradually blue), controls (2,0 mL each, ready-to-use, green and red) and the diluted samples rapidly into the microwells; 100 µL per well. Duplicate measurements are recommended.

Incubate the plate for 30 minutes at room temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

- c. Wash the wells 4 times as in step a.
- d. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the conjugate (14 mL, ready-to-use, yellow); 100 µL per well. Incubate the plate as in step b.
- e. Repeat wash step c.
- f. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the substrate solution (14 mL, ready-to-use, colourless, black vial); 100 µL per well. Incubate the plate as in step b. As the substrate is photosensitive, avoid intense light exposure (e.g. direct sunlight) during incubation.
- g. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless. Caution: corrosive!); 100 µL per well. Use the same sequence as for the substrate. The colour changes from blue to yellow. Agitate the plate, preferably on an orbital shaker, for about 10 seconds.
- h. Immediately read the absorbance in the microwell plate photometer at 450 nm.

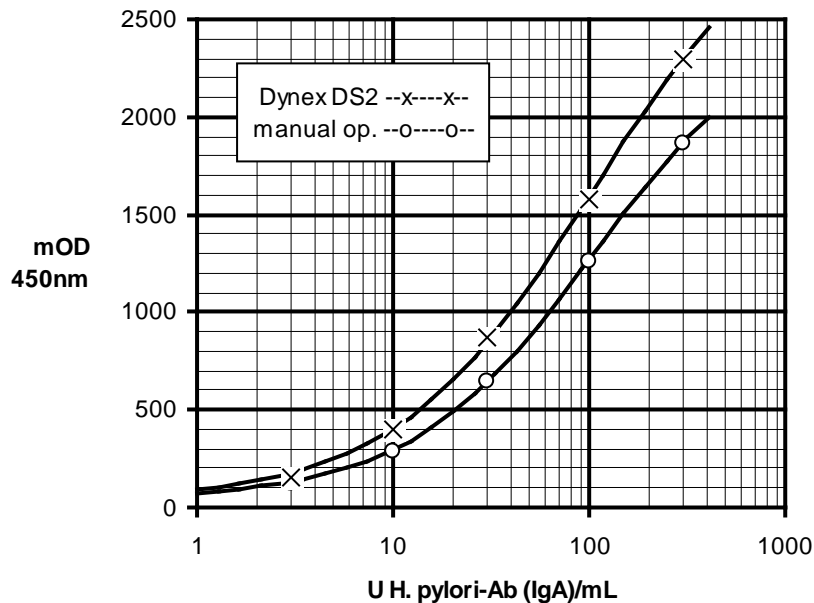
Store the remainder of the reagents refrigerated ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) if they are to be used again.

8.2. Dynex DS2 automated ELISA system

This product has been validated for use with the Dynex DS2 automated ELISA system. A suitable program file for assay execution and evaluation is available on request. The parameters of this program are merely a proposal and may need to be adapted by the operator to the requirements of the actual assay. In general terms, we have attempted to stick as close as possible to the protocol of manual operation, as above. However, due to the necessarily elevated temperature within the DS2, the substrate incubation period had to be shortened. Article 11.8. gives a performance comparison between manual assay operation and the DS2 ELISA system.

9. Evaluation and quality control

Quantitative evaluation: The data obtained are quantitatively evaluated with the standard curve, as shown below. However, the depicted curve can only serve as a model. It can not substitute the measurement of the calibrators, together with the controls and actual samples. The curve has been constructed with a conventional ELISA evaluation program, using a 4-parameter function. The Spline approximation is also appropriate.



0212FE00.FED/StdKurveV2012J

If no computer-supported evaluation is possible, the standard curve may be drawn by hand. It allows transformation of the absorbance value of a sample into its concentration, i.e. into U H. pylori antibodies (IgA) per mL serum.

Qualitative evaluation: The test may also be evaluated in a qualitative manner. This requires measurement of the positive control only. Nevertheless, measurement and examination of the negative control is recommended (see below: quality control).

In qualitative test evaluation, the absorbance of the samples is compared with the borderline absorbance (= cut-off). It is determined according to the following formula:

$$\text{absorbanceborderline} = \text{absorbancepositive control} \times \text{factor}$$

The factor depends on the kit lot and is quoted in the lot-specific certificate of analysis which is included with each test kit. Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{positive control}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{factor} &= 0,35 \\ \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

In order to gain an impression of how positive a particular sample is for H. pylori-Ab (IgA), one may calculate the ratio, according to the formula:

$$\text{ratio} = \text{absorbance}_{\text{sample}} / \text{absorbance}_{\text{borderline}}$$

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbance}_{\text{sample}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Quality control: The positive and negative control check the assay performance. Their authorised values and acceptable ranges, respectively, are quoted in the lot-specific certificate of analysis. Values of the controls have to fall within the indicated ranges; otherwise, the results of the assay are invalidated.

10. Interpretation of results / limitations of the procedure

Based on the measurement of a blood donor and a positive collective of sera (see below), we suggest for the assessment of patient sera:

	quantitative evaluation U H. pylori-Ab (IgA) per mL serum	qualitative evaluation ratio
normal (negative) range	< 7,9	< 0,79
cut-off	11,0	1,00
equivocal range	7,9 - 15,4	0,79 - 1,27
positive range	> 15,4	> 1,27

These specifications are given as an indication only; in order to check their accuracy, each analysis should include parallel samples of normal sera.

A negative test result indicates that the patient does not have an elevated level of IgA antibodies to *H. pylori*. It does not preclude the possibility of a recent infection. If clinical signs are observed, IgM or IgG antibodies directed at *H. pylori* may be determined.

A positive result may be considered as an indication for a *H. pylori* infection and a plausible explanation for a gastrointestinal disorder, as outlined in the beginning. It is not necessarily evidence for active disease.

Specimens exhibiting results between the borderlines quoted above should be considered as equivocal and reported as such. It is recommended that a second sample be collected two weeks later and run in parallel with the first sample to document a possible change of antibody titer.

As with any serological test, the results should be interpreted in the light of the patient's symptoms and other diagnostic criteria.

11. Performance characteristics

11.1. Standardisation

The test is standardised with a purified serum preparation containing IgA antibodies specifically directed at *H. pylori*. This preparation is calibrated against a set of gradually positive sera, solely reserved for this purpose. The degree of sample reactivity is measured in arbitrary units (U/mL) since no international standard is available.

11.2. Analytical specificity

The test permits the specific determination of human IgA antibodies directed against *H. pylori*.

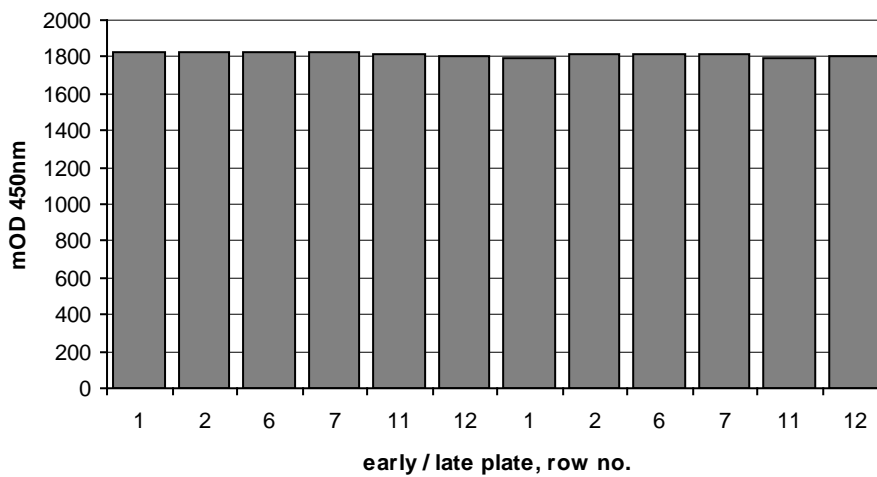
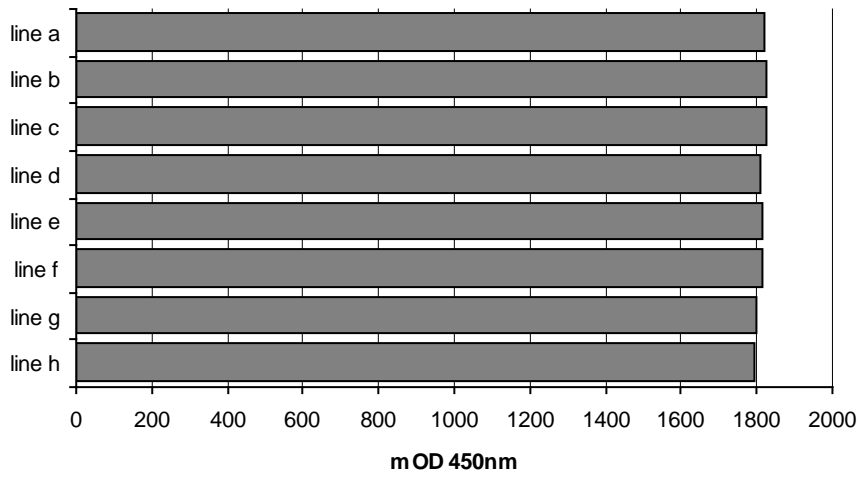
11.3. Detection limit (analytical sensitivity)

The detection limit is defined as that concentration of analyte that corresponds to the mean absorbance of sample buffer plus 3-fold standard deviation (s). It was determined as < 1 U *H. pylori*-Ab (IgA) per mL serum ($n = 24$). Recommended measuring range: 2 - 200 U *H. pylori*-Ab (IgA) per mL serum

11.4. Homogeneity of the solid phase

Measurement of the solid phase homogeneity is regular QC part of each production lot. This is determined by 288-fold measurement of an IgG-positive but non-saturating sample on 3 selected plates. Acceptance criterion: mOD-coefficient of variation (cv) over the plates $< 8\%$. The figure below shows a representative excerpt (solid phase lot no. 12011) of such an analysis.

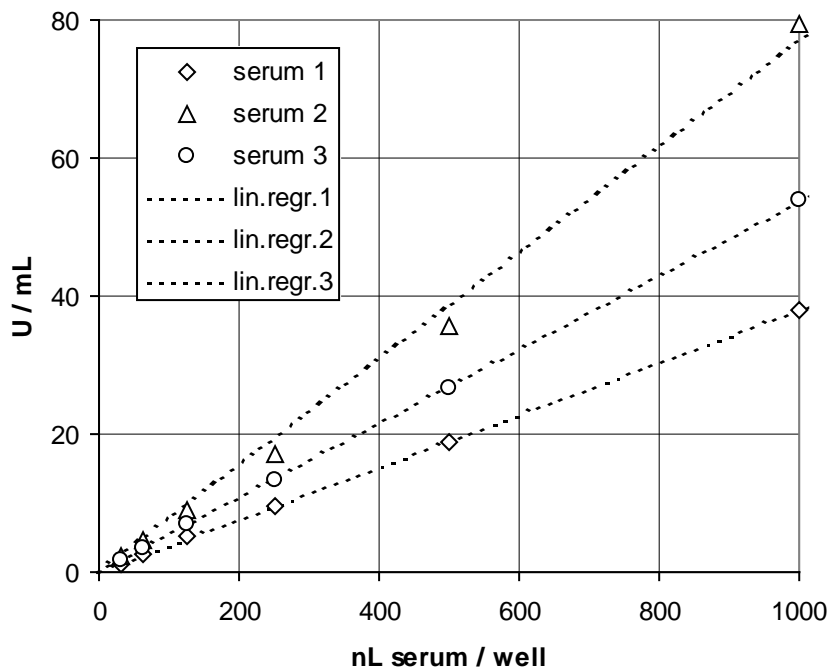
plate	early (n/10)						late (9n/10)						mean	cv%
row	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
line a	1843	1836	1802	1815	1835	1813	1793	1817	1812	1810	1827	1819	1819	0,8
line b	1825	1828	1828	1844	1826	1817	1810	1821	1805	1838	1817	1845	1825	0,7
line c	1833	1836	1843	1843	1837	1820	1806	1830	1831	1834	1797	1814	1827	0,8
line d	1830	1818	1835	1829	1797	1802	1800	1798	1820	1814	1781	1802	1811	0,9
line e	1802	1830	1833	1844	1811	1799	1809	1811	1803	1846	1794	1804	1816	1,0
line f	1830	1837	1827	1824	1791	1814	1799	1819	1823	1817	1780	1813	1815	0,9
line g	1819	1828	1799	1786	1786	1791	1787	1795	1785	1804	1777	1803	1797	0,8
line h	1823	1808	1809	1795	1799	1757	1773	1792	1807	1790	1781	1772	1792	1,1
mean	1826	1828	1822	1823	1810	1802	1797	1810	1811	1819	1794	1809	1813	
cv%	0,7	0,6	0,9	1,2	1,1	1,1	0,7	0,8	0,8	1,0	1,0	1,1		1,1



0212FE00.FED/FphHomV2012J

11.5. Linearity

In order to assess the dose-response relationship of the test, positive sera were measured in serial 2-fold dilution. Acceptance criterion: linear regression of 4 successive dilutions must yield a correlation factor > 0,98. A typical result is depicted below.



0212FE00.FED/LinearV2012J

11.6. Precision

For the assessment of the test precision, the variability of results under the following conditions was determined: a. within 1 assay and between 3 assays, b. between 3 operators and c. between 2 kit lots.

a. Intra- and inter-assay variability (n = 24 and 72, respectively)

sample	mean U/mL	variability (cv, %)	
		intra-assay	inter-assay
1	15	1,2	1,5
2	42	1,6	2,0
3	65	2,9	3,0

b. Operator to operator variability (n = 12)

sample	mean U/mL	variability (cv, %)
1	16	2,7
2	42	3,3
3	74	5,5

c. Variability between 2 kit lots (n = 6)

sample	mean U/mL	variability (cv, %)
1	15	2,8
2	42	5,9
3	72	3,5

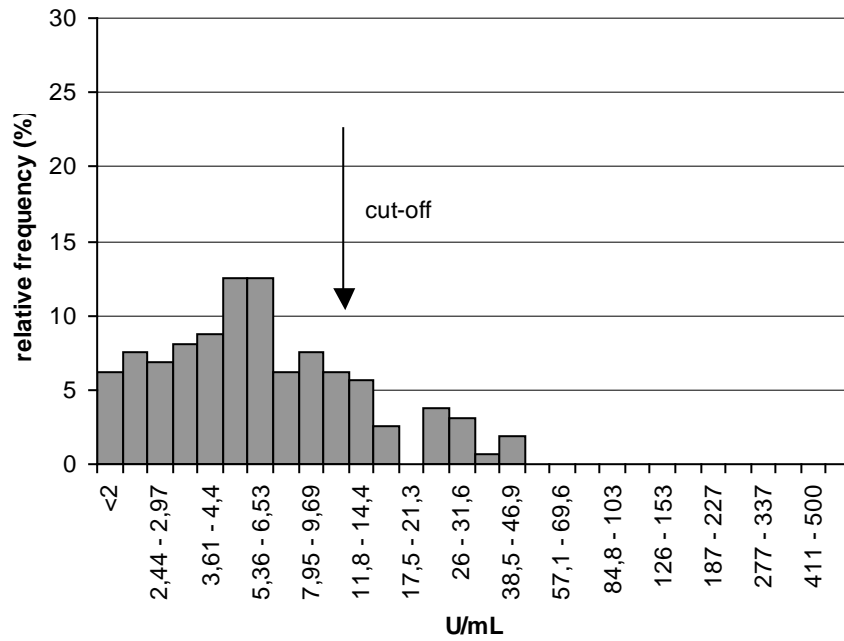
11.7. Frequency distribution of H. pylori-Ab (IgA)

This was analysed in a sera collective of blood donors, equally distributed by sex and age, and a collective of sera found positive according to a CE-compliant reference ELISA. The following distribution of the analyte was observed:

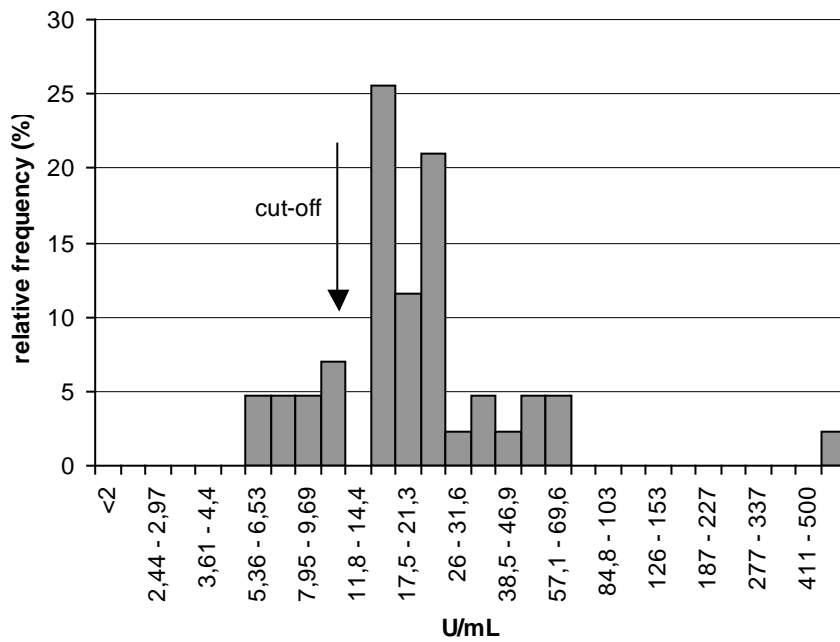
blood donor sera	positive sera
n: 160	n: 43
mean: 8,0 U/mL	mean: 34 U/mL
mean + s: 16 U/mL	mean - s: < 0 U/mL
mean + 2s: 24 U/mL	mean - 2s: < 0 U/mL
median: 5,4 U/mL	median: 18 U/mL
95 th percentile: 26 U/mL	5 th percentile: 7,0 U/mL

ROC-analysis of these data was used to determine the cut-off as 11,0 U/mL (5). Based on this definition, the data presented here suggest a diagnostic specificity and sensitivity of the ELISA of about 79 and 81 %, respectively. These values apply for the measured sera only; other collectives may yield different results.

blood donor sera



positive sera



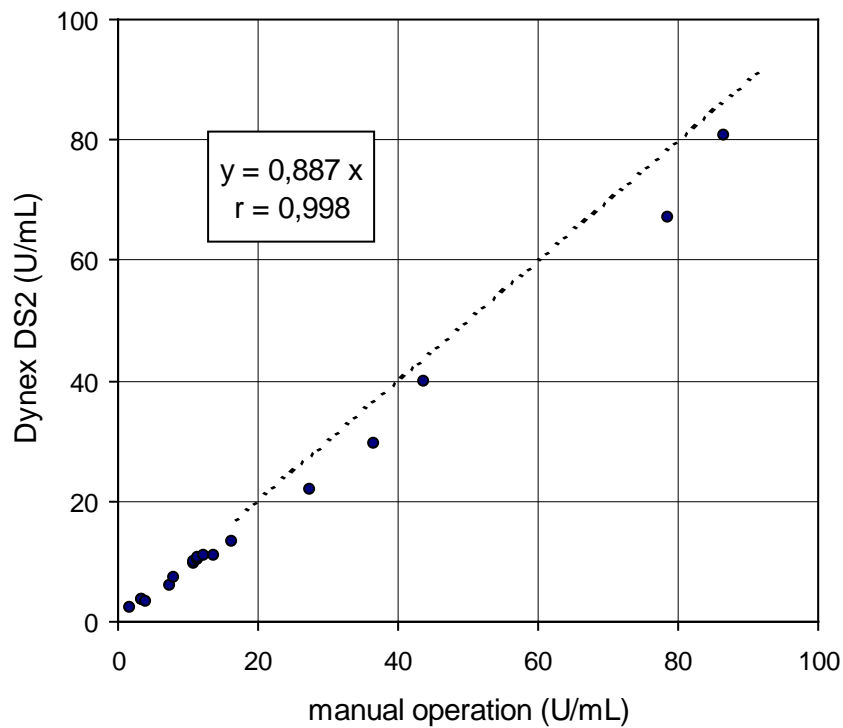
11.8. Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system

Variability: Using specimen of one and the same kit lot, the variability of assay results were compared between manual operation and the Dynex DS2 automated ELISA system:

	manual operation	Dynex DS2
intra-assay variability (n = 16)	mean cv = 3,0 %	mean cv = 3,5 %
inter-assay variability (n = 48)	mean cv = 4,3 %	mean cv = 3,9 %

Standard curve: depicted in chapter 9

Correlation:



0212FE00.FED/KorrDynexDS2-V2012J

12. Warranty

Euro Diagnostica AB guarantees that the product delivered has been thoroughly tested to ensure that its properties specified herein are fulfilled. No further warranties are given.

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any modification in the procedure may affect the results in which case Euro Diagnostica AB disclaims all warranties whether expressed, implied or statutory. Moreover, Euro Diagnostica AB accepts no liability for any damage, whether direct, indirect or consequential, which results from inappropriate use or storage of the product.

13. Symbols



Catalogue number



Batch code



Contains sufficient for $\langle n \rangle$ tests



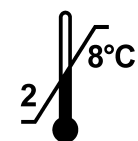
In vitro diagnostic medical device



Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive



Keep away from sunlight



Temperature limit



Use-by date



Consult Instructions for use



Biological risks



Manufacturer

14. References

1. Dunn, B. E., et al.: *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 10 (1997), 720 - 741
2. Mitchell, H. M.: The epidemiology of *Helicobacter pylori*. Curr Topics Microbiol Immunol 241 (1999), 12 - 30
3. Asaka, M., et al.: Long-term *Helicobacter* infection - from gastritis to gastric cancer. Aliment Pharmacol Therapeutics 12 (1998), 9 - 15
4. Azuma, T., et al.: Review: Diagnosis of *Helicobacter* infection. J Gastroenterol Hepatol 11 (1996), 662 - 669
5. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. Wien Klin Wochenschr 104/4 (1992), 86 - 92

15. Summary flow chart

- a. Dilute the sera 1/100 in sample buffer (100 mL, ready-to-use, orange) and mix.
- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with water and mix.
- c. Wash the wells once with 350 μ L wash buffer each. Dispense 100 μ L of the calibrators (2,0 mL each, ready-to-use, gradually blue) and controls (2,0 mL each, ready-to-use, green and red) and of the diluted samples into the wells of the solid phase. Duplicate measurements are recommended. Incubate for 30 minutes at room temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$).
- d. Wash the wells 4 times with 350 μ L wash buffer each.
- e. Dispense 100 μ L of the conjugate (14 mL, ready-to-use, yellow) into the wells. Incubate as in step c.
- f. Repeat washing step d.
- g. Dispense 100 μ L of the substrate solution (14 mL, ready-to-use, black vial) per well. Incubate as in step c. Then, add 100 μ L stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless) per well and agitate the plate briefly.
- h. Immediately measure the absorbance at 450 nm.
- i. Quantitative evaluation: Determine the standard curve and, using this curve, transform the absorbance of the samples into their respective antibody concentration (U H. pylori Ab (IgA) / mL serum).
- j. Qualitative evaluation: Determine the borderline absorbance by multiplying the absorbance of the positive control with the factor shown in the certificate of analysis. Then, calculate the ratio of the samples by dividing their absorbance by the borderline absorbance.



Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00 E-mail: info@eurodiagnostica.com

Fax: +46 40 43 22 88 Internet: www.eurodiagnostica.com

Gebrauchsanweisung

EULISA Helicobacter pylori IgA

Verwendungszweck

Enzym-Immunoassay zum Nachweis von IgA-Antikörpern
gegen Helicobacter pylori

Mikrotitration 96 Kavitäten
Kit bei +2-8°C lagern
Nur für in vitro-diagnostische Anwendung



Dokument No. E-23-0231-02

März, 2015

EULISA Helicobacter pylori IgA

English: page 1

Deutsch: Seite 20



211296



96

Inhalt

1. Einführung und Hintergrund
2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen
3. Testprinzip
4. Inhalt des Testkits
5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien
6. Aufbewahrung des Testkits
7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben
8. Durchführung des Tests
 - 8.3. Manuelle Durchführung
 - 8.4. Dynex DS2 automatisches ELISA System
9. Auswertung und Qualitätskontrolle
10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode
11. Testcharakteristika
 - 11.1. Standardisierung
 - 11.2. Analytische Spezifität
 - 11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)
 - 11.4. Homogenität der Festphase
 - 11.5. Linearität
 - 11.6. Präzision
 - 11.7. Häufigkeitsverteilung von H. pylori-AK (IgA)
 - 11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
12. Garantie und Haftung
13. Symbole
14. Literatur
15. Kurzanleitung

Das hier beschriebene Produkt wurde in Übereinstimmung mit der IVD-Direktive 98/79/EG hergestellt.

1. Einführung und Hintergrund

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein Gram-negatives Bacterium, das die Magenschleimhaut infiziert (1). Diese Infektion kann verschiedene Erkrankungen des Magens und des Zwölffingerdarms auslösen, bspw. aktive chronische Gastritis oder Geschwüre (2). Außerdem erhöht sie offenbar das Risiko, an Magenkrebs zu erkranken (3). Zur Diagnose der Infektion hat sich u. a. der serologische Nachweis von *H. pylori*-Antikörpern bewährt (4). Das Bakterium kann durch antimikrobielle Behandlung (Antibiotika, kombiniert mit Wismut) erfolgreich ausgerottet werden.

Der vorliegende Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, *H. pylori*-Antikörper (IgA) in menschlichem Serum zu bestimmen. Er kann für qualitative Messungen verwendet werden, etwa zum Screening vor der Endoskopie, oder quantitativ zur Therapie-Kontrolle. Beim immobilisierten Antigen handelt es sich um einen gereinigten Extrakt aus *H. pylori*, ATCC-Stamm 43504. Er besteht aus spezifischen, nativen Zelloberflächen-Proteinen, unter ihnen das Schlüsselantigen Urease. Außerdem enthält er das Cag-A Protein (codiert durch das Cytotoxin-assoziierte Gen A); es wird nur von den virulenteren *H. pylori*-Stämmen exprimiert.

Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30-30-30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien). 6 Standards erlauben quantitative Messungen; eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes.

2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der Test ist ausschließlich für die in vitro-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren.

Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Probenpuffer, Standards und Kontrollen enthalten Na-Azid als Präservativ. Der Waschpuffer enthält Bromonitrodioxan als Präservativ, das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H_2SO_4), ist sauer und ätzend.

Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem

Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen.

Na-Azid kann mit Kupfer- und Bleirohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die Standards und Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC. Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung. Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.

3. Testprinzip

Die Kavitäten der Festphase sind beschichtet mit ausgewählten H. pylori-Antigenen. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: H. pylori-Antikörper aus der Probe binden an das immobilisierte Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.
2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgA gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.
3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an H. pylori-Antikörpern (IgA) in der Probe wider.

4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit H. pylori-Antigen und hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 Streifen, die sich jeweils in 8 Einzelkavitäten teilen lassen.

MWP	12x8
------------	-------------

- b. Probenpuffer, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt. Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid.

BUF	SPL
------------	------------

- c. Waschpuffer, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt. Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan.

BUF	WASH	10x
------------	-------------	------------

- d. 6 Standards à 2,0 mL, 0 - 3,0 - 10 - 30 - 100 und 300 U H. pylori-Antikörper (IgA) / mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CAL	1-6
------------	------------

- e. Negative und positive Kontrolle, je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CONTROL	-
----------------	----------

CONTROL	+
----------------	----------

- f. Anti-human IgA HRP-Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

CONJ	IgA
-------------	------------

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H₂O₂, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

SUBS	TMB
-------------	------------

- h. Stopplösung (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.



- i. Gebrauchsinformation
j. Chargen-spezifisches Analysen-Zertifikat

5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

- a. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
b. Messzylinder, 1000 mL
c. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
d. Pipetten für 10, 100 und 1000 µL (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
e. Mikrowell-Plattenwascher (optional)
f. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter
g. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

6. Aufbewahrung des Testkits

Der Testkit muss bei 2 - 8°C gelagert werden. Er ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach nicht mehr verwenden.

7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.

- a. Den Beutel mit der Festphase akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem

Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen. Diesen hermetisch verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.

- b. Das Waschpuffer-10x-Konzentrat (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 - 8°C ist diese Lösung für mehrere Wochen stabil.
- c. Präparation der Proben: Patientenseren als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben. Sie werden mit dem Probenpuffer 1:100 in Reagenzröhrchen verdünnt; bspw. 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Standards, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Microwell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 - 8°C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, so müssen sie eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Aufgetaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

Anforderungen an die Proben: Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

8. Durchführung des Tests

8.1. Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) angenommen haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist **sorgfältiges Waschen** ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die **Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen**. Dazu klopft man die Festphase auf Saugpapier aus. Automatische Wascher müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- a. Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten einmal mit je 350 µL Waschpuffer füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.

- b. Je 100 µL der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben zügig in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen.

Die Kavitätenplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) inkubieren.

- c. Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.
- d. Je 100 µL Konjugat (14 mL, gebrauchsfertig, gelb) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.
- e. Waschschrift c wiederholen.
- f. Je 100 µL Substrat (14 mL, gebrauchsfertig, farblos, im schwarzen Gefäß) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b. Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.
- g. Je 100 µL Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Vorsicht ätzend!) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb. Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig agitieren, am besten auf einem Schüttler.
- h. Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450 nm messen.

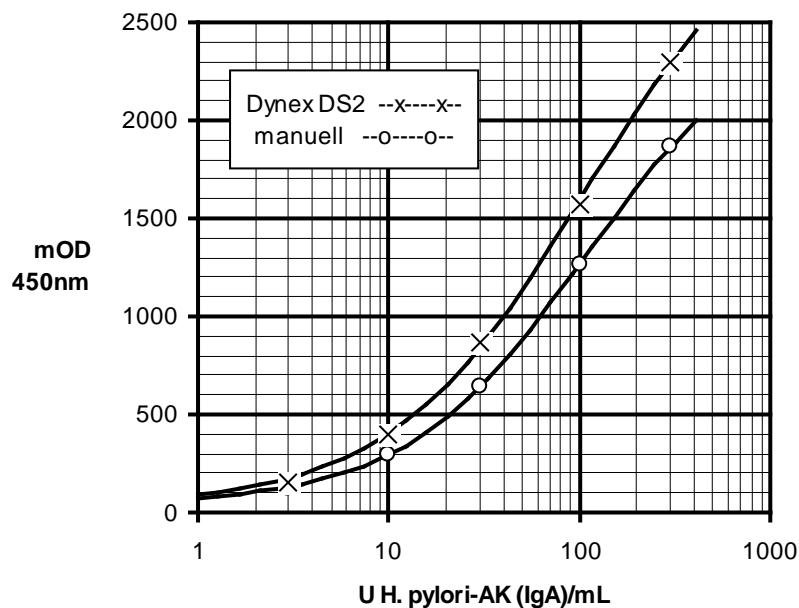
Überschüssige Reagenzien weiter bei 2 - 8°C lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine entsprechende Programmdatei für die Assay-Durchführung und Auswertung kann zur Verfügung gestellt werden. Die Parameter dieses Programms sind nur als Vorschlag zu verstehen und müssen evtl. vom Anwender an die Erfordernisse des aktuellen Tests angepasst werden. Generell haben wir versucht, so eng wie möglich am manuellen Protokoll (s.o.) zu bleiben. Allerdings musste die Substrat-Inkubationsdauer verkürzt werden wegen der zwangsläufig erhöhten Temperatur innerhalb des Geräts. Abschnitt 11.8. vergleicht Ergebnisse der manuellen Durchführung und des DS2 ELISA Systems.

9. Auswertung und Qualitätskontrolle

Quantitative Auswertung: Die Messdaten werden anhand einer Standardkurve quantitativ ausgewertet. Die unten dargestellte Kurve kann jedoch nicht die Messung der Standards bei der Testdurchführung ersetzen, zusammen mit den Kontrollen und den aktuellen Proben. Sie dient lediglich als Modell. Die Kurve wurde von einem üblichen ELISA Auswertungsprogramm mit einer 4-Parameter-Funktion errechnet; die Spline-Approximation ist ebenso geeignet.



0212FE00.FED/StdKurveV2012J

Steht keine Rechner-gestützte Auswertung zur Verfügung, so zeichnet man die Standardkurve per Hand und liest an ihr die AK-Konzentration in den Proben ab (U H. pylori-Antikörper (IgA) / mL Serum).

Qualitative Auswertung: Der Test kann auch auf qualitative Art ausgewertet werden. Dazu muss nur die positive Kontrolle gemessen werden; allerdings empfiehlt es sich, auch die negative Kontrolle zu messen (s.u.: Qualitätskontrolle).

Bei der qualitativen Testauswertung wird die Absorption der Proben mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off) verglichen. Diese errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Absorption}_{\text{cut-off}} = \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei. Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe an H. pylori-AK (IgA) ist, kann man ihre Ratio berechnen, nach der Formel:

$$\text{Ratio} = \text{Absorption}_{\text{Probe}} / \text{Absorption}_{\text{cut-off}}$$

Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{Absorption}_{\text{Probe}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{Ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Qualitätskontrolle: Die positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweiligen Sollwerte und akzeptablen Bereiche sind im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests nicht gültig.

10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode

Auf der Basis einer Serienmessung von Blutspender- und Positiv-Seren (s.u.) schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

Auswertung	quantitativ U H. pylori-AK (IgA) pro mL Serum	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 7,9	< 0,79
cut-off	11,0	1,00
grenzwertiger Bereich	7,9 - 15,4	0,79 - 1,27
positiver Bereich	> 15,4	> 1,27

Diese Spezifikationen sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten in jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass der Patient keinen erhöhten Titer an IgA-Antikörpern gegen H. pylori aufweist. Dies schließt die Möglichkeit einer

frischen Infektion jedoch nicht aus. Sind klinische Anzeichen einer Infektion erkennbar, könnten IgM- oder IgG-Antikörper gegen *H. pylori* bestimmt werden.

Ein positives Resultat sollte als Hinweis auf eine *H. pylori*-Infektion interpretiert werden. Es liefert eine plausible Erklärung für eine Erkrankung des Magen-Darm-Trakts, zeigt jedoch nicht zwangsläufig eine aktive Erkrankung an.

Proben mit grenzwertigen Resultaten sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.

11. Testcharakteristika

11.1. Standardisierung

Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das IgA-Antikörper enthält, die spezifisch gegen *H. pylori* gerichtet sind. Es wird seinerseits an einem Satz graduell-positiver Seren kalibriert, der ausschließlich für diesen Zweck reserviert ist. Der Grad der Reaktivität einer Probe wird in willkürlichen Einheiten (U/mL) angegeben, da kein internationaler Standard verfügbar ist.

11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgA-Antikörper nach, die gegen *H. pylori* gerichtet sind.

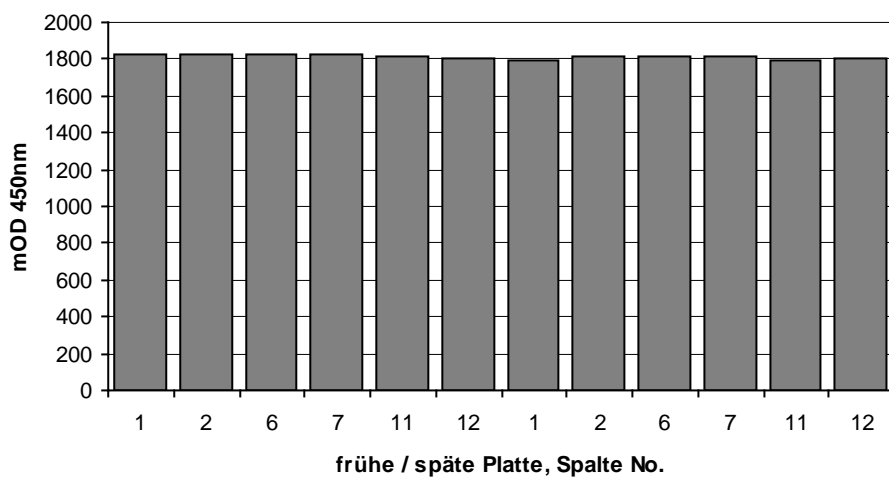
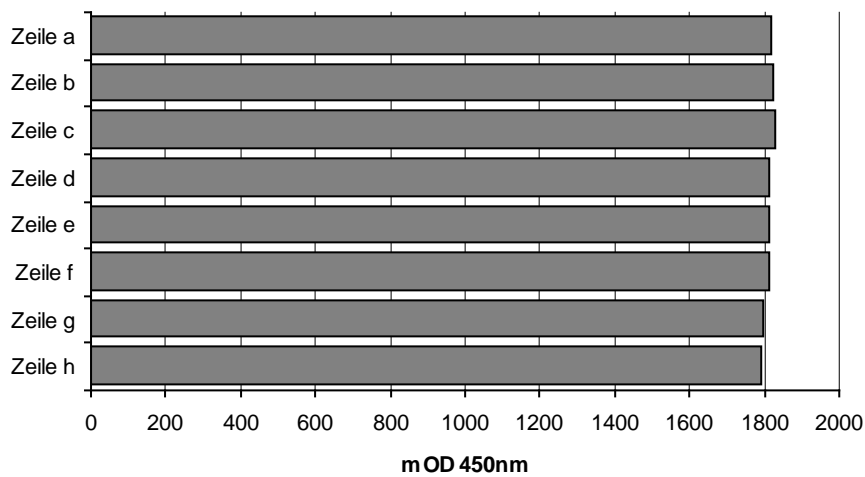
11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu < 1 U *H. pylori*-AK (IgA)/mL Serum bestimmt ($n = 24$). Empfohlener Messbereich: 2 - 200 U *H. pylori*-AK (IgA)/mL Serum

11.4. Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer (IgG)-positiven, aber nicht sättigenden Probe auf 3 ausgewählten Platten. Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK) über die Platten $< 8\%$. Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 1201I).

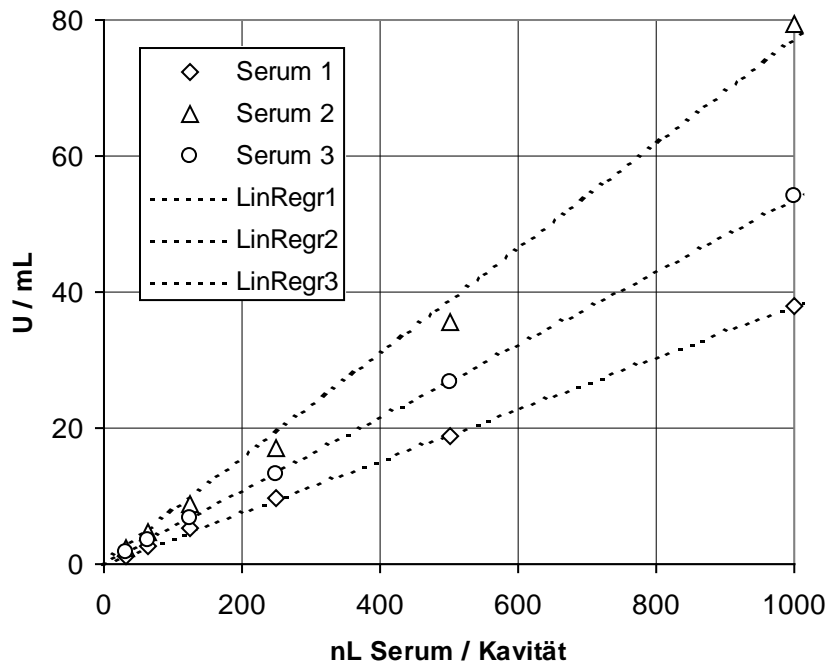
Platte	früh (n/10)						spät (9n/10)						MW	VK %
Spalte	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
Zeile a	1843	1836	1802	1815	1835	1813	1793	1817	1812	1810	1827	1819	1819	0,8
Zeile b	1825	1828	1828	1844	1826	1817	1810	1821	1805	1838	1817	1845	1825	0,7
Zeile c	1833	1836	1843	1843	1837	1820	1806	1830	1831	1834	1797	1814	1827	0,8
Zeile d	1830	1818	1835	1829	1797	1802	1800	1798	1820	1814	1781	1802	1811	0,9
Zeile e	1802	1830	1833	1844	1811	1799	1809	1811	1803	1846	1794	1804	1816	1,0
Zeile f	1830	1837	1827	1824	1791	1814	1799	1819	1823	1817	1780	1813	1815	0,9
Zeile g	1819	1828	1799	1786	1786	1791	1787	1795	1785	1804	1777	1803	1797	0,8
Zeile h	1823	1808	1809	1795	1799	1757	1773	1792	1807	1790	1781	1772	1792	1,1
MW	1826	1828	1822	1823	1810	1802	1797	1810	1811	1819	1794	1809	1813	
VK %	0,7	0,6	0,9	1,2	1,1	1,1	0,7	0,8	0,8	1,0	1,0	1,1		1,1



0212FE00.FED/FphHomV2012J

11.5. Linearität

Um die Dosis / Wirkungs-Beziehung des Tests zu bestimmen, wurden positive Seren in serieller Zweifachverdünnung gemessen. Akzeptanz-Kriterium: Die lineare Regression vierer sukzessiver Verdünnungen muss einen Korrelationsfaktor > 0,98 ergeben. Ein typisches Ergebnis ist hier abgebildet.



0212FE00.FEDLinearV2012J

11.6. Präzision

Um die Präzision des Tests zu ermitteln, wurde die Variabilität der Ergebnisse unter folgenden Bedingungen ermittelt: a. innerhalb eines Assays und zwischen 3 Assays, b. zwischen 3 Anwendern und c. zwischen 2 Kit-Chargen.

a. Intra- und Inter-Assay Variabilität (n = 24 bzw. 72)

Probe	Mittelwert (MW) U/mL	Variabilität (VK, %)	
		intra-Assay	inter-Assay
1	15	1,2	1,5
2	42	1,6	2,0
3	65	2,9	3,0

b. Operator-zu-Operator Variabilität (n = 12)

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	16	2,7
2	42	3,3
3	74	5,5

c. Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n = 6)

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	15	2,8
2	42	5,9
3	72	3,5

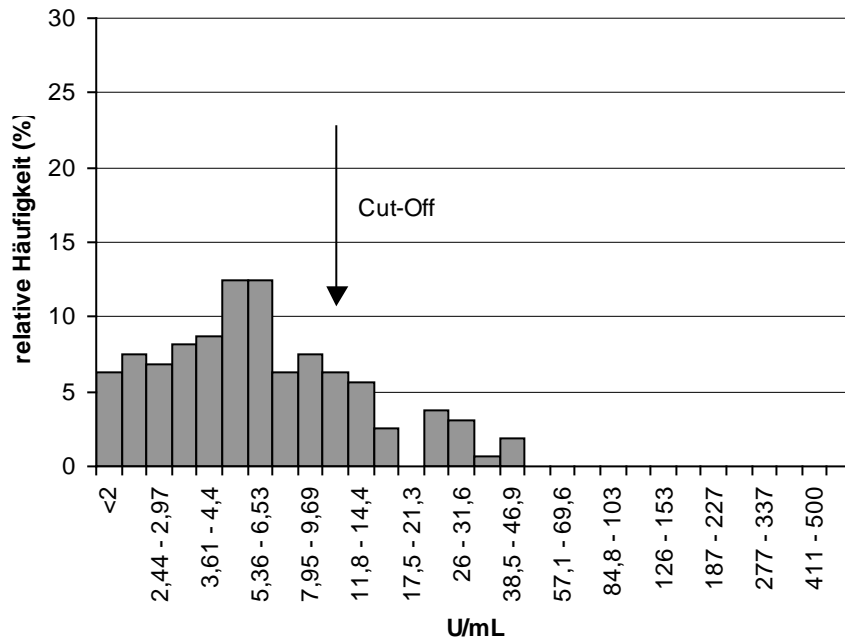
11.7. Häufigkeitsverteilung von H. pylori-AK (IgA)

Diese wurde bestimmt in einem Blutspender-Serenkollektiv, gleichmäßig nach Alter und Geschlecht verteilt, und in einem Serenkollektiv, das positiv in einem CE-konformen Referenz-ELISA gefunden worden war. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

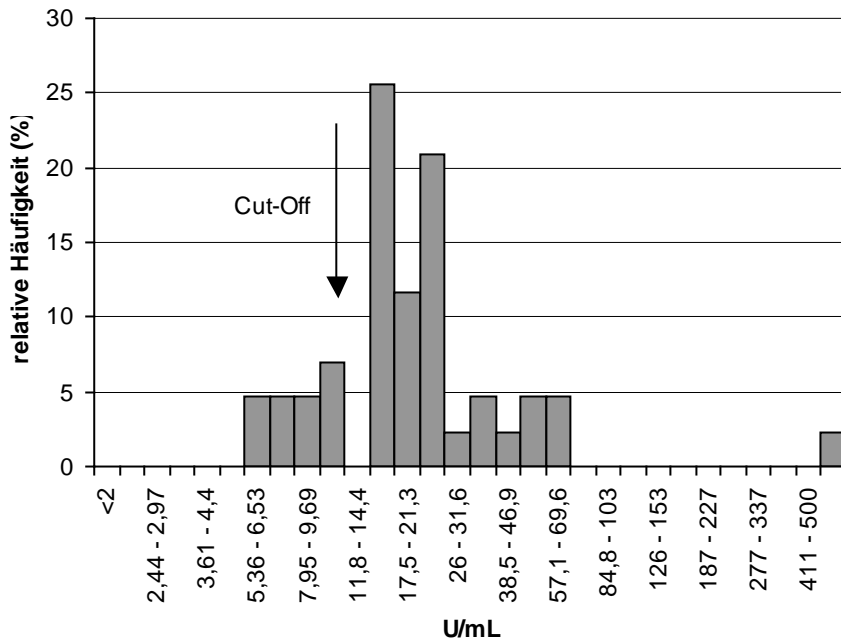
Blutspender-Seren		positive Seren	
n:	160	n:	43
MW:	8,0 U/mL	MW:	34 U/mL
MW + s:	16 U/mL	MW - s:	< 0 U/mL
MW + 2s:	24 U/mL	MW - 2s:	< 0 U/mL
Median:	5,4 U/mL	Median:	18 U/mL
95. Perzentile:	26 U/mL	5. Perzentile:	7,0 U/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 11,0 U/mL bestimmt (5). Mit dieser Definition ergibt sich aus den hier gezeigten Daten eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von ca. 79 bzw. 81 %. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.

Blutspender-Seren



Positiv-Seren

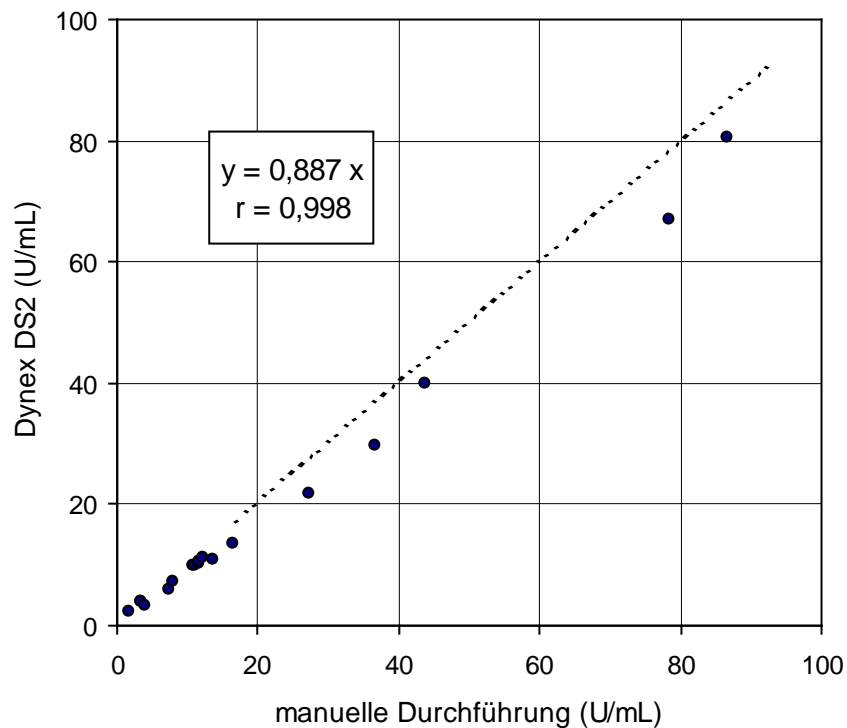


11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
 Variabilität: Mit Testkits aus einer einzigen Produktions-Charge wurde die Variabilität der Assayergebnisse verglichen zwischen manueller Durchführung und dem automatischen DS2 ELISA System:

	manuelle Durchführung	Dynex DS2
intra-Assay Variabilität (n = 16)	mittl. VK = 3,0 %	mittl. VK = 3,5 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 4,3 %	mittl. VK = 3,9 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



0212FE00.FED/Korr/DynexDS2-V2012.J

12. Garantie und Haftung

Euro Diagnostica AB garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben.

Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert Euro Diagnostica AB jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann Euro Diagnostica AB keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

13. Symbole



Artikelnummer



Chargencode



Ausreichend für $\langle n \rangle$ Prüfungen



In-vitro-Diagnostikum



Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu *In-vitro*-Diagnostika



Von Sonnenlicht fernhalten



Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis



Gebrauchsanweisung beachten



Biologische Risiken



Hersteller

14. Literatur

1. Dunn, B. E., et al.: Helicobacter pylori. Clin Microbiol Rev 10 (1997), 720 - 741
2. Mitchell, H. M.: The epidemiology of Helicobacter pylori. Curr Topics Microbiol Immunol 241 (1999), 12 - 30
3. Asaka, M., et al.: Long-term Helicobacter infection - from gastritis to gastric cancer. Aliment Pharmacol Therapeutics 12 (1998), 9 - 15
4. Azuma, T., et al.: Review: Diagnosis of Helicobacter infection. J Gastroenterol Hepatol 11 (1996), 662 - 669
5. Sommer, R., und Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. Wien Klin Wochenschr 104/4 (1992), 86 - 92

15. Kurzanleitung

- a. Die Seren 1/100 in Probenpuffer (100 mL, gebrauchsfertig, orange) verdünnen und durchmischen.
- b. Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers (100 mL, blau) mit Wasser verdünnen und durchmischen.
- c. Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350 µL Waschpuffer waschen. Dann je 100 µL der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot) und der verdünnten Proben in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen sind zu empfehlen. 30 Minuten bei Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) inkubieren.
- d. Die Kavitäten 4x mit je 350 µL Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 µL des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, gelb) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 µL des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100 µL Stoplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos) zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- h. Sofort die Absorption bei 450 nm messen.
- i. Quantitative Auswertung: Die Standardkurve ermitteln und anhand dieser Kurve die Absorption der Proben in ihre jeweilige Antikörper-Konzentration (U H. pylori-AK (IgA)/mL) umformen.
- j. Qualitative Auswertung: Die grenzwertige Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die grenzwertige Absorption dividiert wird.



Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00 E-mail: info@eurodiagnostica.com

Fax: +46 40 43 22 88 Internet: www.eurodiagnostica.com

0212FE60.FWD / 31030