

VIROTECH Helicobacter pylori IgG LINE Immunoblot

(H. pylori IgG LINE-32)

Bestell-Nr.: WE243G32

(H. pylori IgG LINE-96)

Bestell-Nr.: WE243G96

VIROTECH Helicobacter pylori IgA LINE Immunoblot

(H. pylori IgA LINE-32)

Bestell-Nr.: WE243A32

(H. pylori IgA LINE-96)

Bestell-Nr.: WE243A96

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim
Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 31.10.2018

REV 11/VIROTECH H. pylori IgG & IgA LINE Immunoblot DE

Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt	4
4.1 Kit für 32 Bestimmungen.....	4
4.2 Kit für 96 Bestimmungen.....	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	5
8. Untersuchungsmaterial	5
9. Testdurchführung	5
9.1 Vorbereitung der Proben.....	5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien.....	6
9.3 Immunoblot Testdurchführung.....	6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren.....	7
10. Testauswertung	7
10.1 Einsatz der Cut off Kontrolle	7
10.2 Bedeutung der Antigene	7
10.3 Auswertungskriterien.....	8
10.4 Grenzen des Tests.....	8
11. Leistungsdaten	8
11.1 Sensitivität und Spezifität.....	8
11.2 Kreuzreaktivität.....	9
11.3 Durchseuchung (erwartete Werte).....	9
11.4 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit).....	9
11.5 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit).....	9
11.6 Richtigkeit.....	9
12. Literatur	10
13. Symbole	10
14. Testablaufscha	11

1. Verwendungszweck

LINE Testkit zum qualitativen Nachweis von *Helicobacter pylori* spezifischen IgG- bzw. IgA- Antikörpern in Humanserum.

2. Diagnostische Bedeutung

Helicobacter (H.) pylori ist ein auf die Magenschleimhaut spezialisierter gramnegativer Keim, der weltweit etwa 500.000 Todesfälle durch Magenkarzinom verursacht (1, 5).

Erworben wird die Infektion in der Regel in der Kindheit. Die Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch, wobei der enge Kontakt innerhalb der Familie und der sozioökonomische Status eine wichtige Rolle spielen. Dementsprechend ist die Prävalenz in den Entwicklungsländern deutlich höher als in den Industrienationen (6). In Deutschland liegt die Durchseuchung für Erwachsene bei ca. 30% (4).

Eine *H. pylori* Infektion persistiert lebenslang und verursacht eine chronische Gastritis, die häufig ohne klinische Symptome bleibt. Bei 20% der Betroffenen jedoch treten Komplikationen in Form eines Magengeschwürs (Ulcus ventriculi), Zwölffingerdarmgeschwürs (Ulcus duodeni), Magenkarzinoms oder einem MALT- Lymphom (mucosa-associated lymphatic tissue) auf (4).

Durch eine Antibiotika-Therapie ist die Heilung der Ulkuserkrankungen und des MALT-Lymphoms im Frühstadium möglich (4). Die frühzeitige Behandlung kann der Entstehung eines Magenkarzinoms entgegen wirken, d.h. eine schnellst mögliche Diagnostik der *H. pylori* Infektion sollte angestrebt werden.

Bei Patienten ohne Vorbehandlung kann in 80%-96% der Fälle der Keim vollständig beseitigt werden (2). Die Rezidivinfektion nach erfolgreicher *H. pylori* Eradikation ist sehr gering (ca. 1% pro Jahr) (6). Wurde bereits einmal eine Antibiotika Therapie durchgeführt, so sind die Erfolgsquoten bei weiteren Behandlungen aufgrund der zunehmenden Antibiotika-Resistenzen niedriger. Aus diesem Grund wird empfohlen, bei 1-mal vorbehandelten Patienten *H. pylori* aus Magenbiopsien kulturell nachzuweisen und eine Empfindlichkeitstestung durchzuführen (5,6).

Zum Nachweis einer *H. pylori* Infektion können invasive und nicht-invasive Methoden genutzt werden. Zu den invasiven Verfahren zählt der Urease-Schnelltest, die Histologie, die Kultur und die PCR. Bei den genannten Methoden wird der Erreger aus entnommenen Biopsien nachgewiesen. Zu den nicht-invasiven Untersuchungen gehören der Harnstoff-Atemtest, der Stuhl-Antigentest und der Nachweis von Antikörpern aus dem Serum. Alle Tests haben Vor- und Nachteile und sind für sich alleine nicht absolut genau. Die Auswahl der Methode sollte daher anhand der vorliegenden Fragestellung getroffen werden (6).

Die Serologie findet Einsatz

- als Erstuntersuchung bei nicht vorbehandelten Patienten (2)
- bei der Therapiekontrolle im Langzeitverlauf (1)
- bei seroepidemiologischen Fragestellungen (3).

Die Serologie ist indiziert in Fällen mit verminderter Keimdichte z.B. bei:

- ausgeprägter Atrophie der Magenschleimhaut
- Magenblutung
- Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren.

Während alle anderen Methoden in den genannten Fällen falsch negativ sein können, ist der Nachweis *H. pylori* spezifischer Antikörper mit gleichbleibender Sensitivität möglich (2).

3. Testprinzip

Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Humanserum/-plasma-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit dem auf den Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschriffe, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG-bzw. IgA- Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschriffe entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blauviolette Banden (Antigen-Banden) erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der Nitrozellulosestreifen mit

Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG- bzw. IgA-Antikörpern schließen.

4. Packungsinhalt

4.1 Kit für 32 Bestimmungen

1. IgG bzw. IgA Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprützten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig	1x	32 Streifen
2. IgG bzw. IgA Cut off Kontrolle, Humanserum, konzentriert, vorverdünnt	1x	1,0 ml
3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	2x	50 ml
4. IgG- bzw. IgA- Konjugat (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel	1x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig	1x	57 ml
6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse	1x	1 Stk.

4.2 Kit für 96 Bestimmungen

1. IgG bzw. IgA Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprützten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig	3x	32 Streifen
2. IgG bzw. IgA Cut off Kontrolle, Humanserum, konzentriert, vorverdünnt	2x	1,0 ml
3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	4x	50 ml
4. IgG- bzw. IgA- Konjugat (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel	3x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig	3x	57 ml
6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse	3x	1 Stk.

Auf Anfrage zusätzlich erhältlich:

IgG bzw. IgA -Positive Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikat entnehmen.

(Best.-Nr.: IgG: WE243P60 bzw. IgA: WE243P40)

IgG/IgA -Negative Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.

(Best.-Nr.: IgG/IgA: WE243N20)

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

- Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
- Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
- Nitrozellulose Teststreifen:** Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblässen der Banden zu vermeiden.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	unverdünnt	+2 bis +8°C	1 Woche
Teststreifen	nach Öffnen	+2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel)	3 Monate
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate

	verdünnt	+2 bis +8°C	ca. 6h
Substrat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	oder Raumtemperatur	2 Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
4. Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Inkubationswanne (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
2. Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
3. Eine Spritzflasche zum Abstoppen
4. Pipette oder Handwaschgerät
5. Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
6. Pipettenspitzen
7. Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
8. Plastikpinzette
9. Aqua dest. oder deionisiert
10. Filterpapier

8. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Packungsbeilage nur Serum erwähnt ist.

9. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

9.1 Vorbereitung der Proben

1. Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum/Plasma im IgG und 30 µl Serum/Plasma im IgA benötigt.
2. Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma). Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
4. Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
5. Getrübe Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

9.2 Vorbereitung der Reagenzien

1. Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs und EcoBlots in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.
2. Vor Verdünnung alle Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
3. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
4. **Verdünnungs-/Waschpuffer**
Der Verdünnungs-/ Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/ Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen.
Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/ Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/ Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.
5. **IgG- bzw. IgA-Konjugat**
Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: sTestablaufschema%).
6. **Substratlösung**
Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

9.3 Immunoblot Testdurchführung

Achtung: Die Nitrozellulose Teststreifen dürfen nur in der freigegebenen Ig-Klasse getestet werden (siehe Etikett auf dem Blothefchen und Bezeichnung auf jedem einzelnen Teststreifen).

Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des Helicobacter pylori LINE, muss bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.
5. Je **15µl Patientenserum/-plasma im IgG und 30µl Patientenserum/-plasma im IgA**; bzw. **100µl der Cut off / Positiven / Negativen Kontrolle** zupipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum und Kontrolle **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.
7. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrilles die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.

11. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.
12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.
14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.
15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Streifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtern Ihnen die Auswertung der Patientenproben.

Testablaufschema siehe letzte Seite

9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

10. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control):

Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.

2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control):

Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.

Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

10.1 Einsatz der Cut off Kontrolle

Banden, deren Intensität schwächer als die Cut off Bande der Cut off Kontrolle sind, werden nicht in die Bewertung einbezogen.
IgG und IgA Cut off Bande: Cag A

10.2 Bedeutung der Antigene

Antigen/ Bezeichnung	Molekulargewicht	Bedeutung der Antigene	Spezifität der Antikörper im LINE	Kommt vor bei <i>H. pylori</i>
CagA (Cytotoxin-associated-gene A)	140 kD	CagA wird in Wirtszellen geschleust und zerstört auf diesem Weg u.a. säureproduzierende Magenzellen. Dies begünstigt wiederum die Entstehung von Magen-Ulzera und von Magenkarzinomen. Charakteristisch für die besonders virulenten Stämme Typ I, fehlt bei den weniger virulenten Stämmen Typ II. Hochimmunogen	Hochspezifisch	Typ I
VacA	87 kD	VacA wird in das umgebende Medium abgegeben, verursacht Zellschädigungen in der Magenschleimhaut und wirkt lokal immunsuppressiv (12).	Hochspezifisch	Typ I

(Vacuolating Cytotoxin A)		Charakteristisch für die besonders virulenten Stämme Typ I, fehlt bei den weniger virulenten Stämmen Typ II. AK Antwort unregelmäßiger im Vergleich zu CagA		
p30	30 kD	Noch nicht charakterisiertes Protein.	Hochspezifisch	Typ I und Typ II
UreA UreaseA Untereinheit	26 kD	Die Urease A zeigt keine Ähnlichkeit mit Ureasen anderer Organismen und ist somit ein hochspezifischer Marker für eine Helicobacter pylori-Infektion.	Hochspezifisch	Typ I und Typ II
P25	25 kD	Membranprotein, das die Anbindung von Helicobacter pylori an die Epithelzellen des Magens vermittelt (13).	Hochspezifisch	Typ I und Typ II
p19	19 kD	Noch nicht näher charakterisiertes Membranprotein	Hochspezifisch	Typ I und Typ II

10.3 Auswertungskriterien

Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

Empfohlene IgG-, IgA- Beurteilung

Aufgetretene Bande(n) - Cut off Bande	Interpretation
Keine Banden oder nur eine Bande von: p30, p19	negativ
Nur eine Bande von: VacA, UreA, p25	auffällig
CagA oder Auftreten von 2 Banden der folgenden: VacA, p30, UreA, p25, p19	positiv

10.4 Grenzen des Tests

1. In seltenen Fällen können Patientenserum %inverse+Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblot ist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.
2. Die Persistenz der IgA-Antikörper nach erfolgreicher Behandlung kann 6 Monate bis 3 Jahre betragen. Die IgG-Antikörper persistieren in der Regel viele Jahre.

11. Leistungsdaten

11.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden Routineseren und Blutspenderseren im Helicobacter pylori LINE und im Westernblot getestet.

IgG: Routineseren (n=42) + Blutspenderseren (n=77)

		Helicobacter pylori LINE IgG		
Helicobacter pylori EcoBlot	(n=119)	negativ	grenzwertig	positiv
	negativ	60	0	1
	grenzwertig	2	0	2
	positiv	0	0	54

5 diskrepante Seren (3 Blutspenderseren, 2 Routineseren) gehen nicht mit in die Bewertung ein. Sie wurden in einem zweiten Referenztest getestet; die beiden Referenzsysteme zeigten keine übereinstimmenden Ergebnisse.

IgA: Routineseren (n=41) + Blutspenderseren (n=79)

		Helicobacter pylori LINE IgA		
Helicobacter pylori EcoBlot	(n=120)	negativ	grenzwertig	positiv
	negativ	72	1	0
	grenzwertig	7	0	1
	positiv	3	2	34

3 diskrepante Seren (1 Blutspenderserum, 2 Routineseren) gehen nicht mit in die Bewertung ein. Sie wurden in einem zweiten Referenztest getestet; die beiden Referenzsysteme zeigten keine übereinstimmenden Ergebnisse.

11.2 Kreuzreaktivität

Grundsätzlich können Kreuzreaktionen zu *Campylobacter* aufgrund der Antigenverwandtschaft nicht ausgeschlossen werden (14).

11.3 Durchseuchung (erwartete Werte)

Die folgende Tabelle zeigt die Austestung von 77 Blutspenderseren im IgG und 79 Seren im IgA.

IgG	Anzahl (n=77)	%
negativ	50	64,9
grenzwertig	0	0
positiv	27	35,1

IgA	Anzahl (n=79)	%
negativ	60	75,9
grenzwertig	1	1,3
positiv	18	22,8

11.4 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit wurden für IgG und für IgA jeweils in einem Versuchsansatz 30 Blotstreifen einer Nitrozellulosemembran mit einem positiven Serum inkubiert. Das Serum zeigte im IgG und im IgA einheitlich starke Intensitäten auf dem gesamten Nitrozellulose-Sheet.

11.5 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden für IgG und IgA zwei positive und ein negatives Serum getestet. Die Bestimmung erfolgte in 10 unabhängigen Testansätzen von 3 unterschiedlichen Testpersonen.

In allen Testungen wurden die serologischen Vorgaben getroffen.

11.6 Richtigkeit

Es wurden 21 Ringversuch-Seren im IgG und 19 Ringversuch-Seren im IgA getestet.

IgG	Helicobacter pylori LINE IgG
-----	------------------------------

RV-Sollvorgabe	positiv	negativ
positiv	13	0
negativ	0	8

IgA	Helicobacter pylori LINE IgA		
	positiv	grenzwertig	negativ
RV-Sollvorgabe			
positiv	6	0	0
grenzwertig/positiv	0	1	0
negativ	0	0	10
negativ/grenzwertig	0	2	0

Alle Ringversuch-Sollvorgaben werden getroffen.

12. Literatur

1. Helicobacter pylori . Von der Grundlage zur Therapie (1996) Herausgeber P. Malfertheiner, Thieme Verlag
2. Homepage, Nationales Referenzzentrum für Helicobacter pylori; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg (2010)
3. Zöller et al (1993) Nachweis der Helicobacter pylori-Infektion: Rolle der Immundiagnostik. *Klin. Lab.* 39: 45-54
4. Epidemiologisches Bulletin, 2005, Nr. 24
5. Kist M., Glocker E., Suerbaum S., Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion, Bundesgesundheitsblatt, 2005
6. *Helicobacter-pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit, AWMF-Leitlinien-Register, Nr. 021/001, 2008
7. Figura N., Helicobacter exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996;10, Suppl. I : 79-96
8. Xiang Z., et al., Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin., *Infect. Immun.* 1995 Jan., 63 (I):94-98
9. Covacci A.S. et al., Molecular characterisation of the 128 kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *PNAS*, 1993, 90:5791
10. Cover T.L. et al., Serologic detection of infection with cagA + Helicobacter pylori strains, *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33 (6), 1496-1500
11. Weel J.F.L., The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin and Helicobacter pylori-related diseases, *JID*, 1996, 173: 1171-5
12. Gebert B. et al., The Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolating to immunosuppressive activities, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152(1): 205-220
13. Moran Anthony P. et al., In vivo expression of the 25-kDa laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43 (2005) 331-337
14. Newell, D. G. (1986). Identification of the outer membrane proteins of *Campylobacter pyloridis* and antigenic cross-reactivity between *C. pyloridis* and *C. jejuni*. *Journal of General Microbiology* **133**, 163-170.

13. Symbole



Siehe Gebrauchsanweisung!

14. Testablaufschemata

Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	30 Minuten	15 µl Patientenserum/-plasma im IgG; 30 µl Patientenserum/-plasma im IgA / 100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Waschen	3 x 5 Minuten	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	30 Minuten	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100)
Waschen	3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	10 ± 3 Minuten	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	3 x ohne Zwischeninkubation	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

Anzahl Streifen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnungs/ Waschpuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugat-Konzentrat	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Endvolumen	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Anzahl Streifen	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Verdünnungs/ Waschpuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugat-Konzentrat	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Endvolumen	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Anzahl Streifen	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Verdünnungs/ Waschpuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugat-Konzentrat	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Endvolumen	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Anzahl Streifen	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Verdünnungs/ Waschpuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugat-Konzentrat	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Endvolumen	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml