



VIRO-BLOT ANTI – H. PYLORI - IgG/IgA

Instruction for use

Immunoblot for qualitative determination of antibodies to *Helicobacter pylori* in human serum and plasma

IgG	REF BG 125/20	▽ 20	IVD	complete kit
IgG	REF BG 125/8	▽ 8	IVD	complete kit
IgA	REF BA 125/20	▽ 20	IVD	complete kit
IgA	REF BA 125/8	▽ 8	IVD	complete kit

Antigen Characterisation

Antigen: *H. pylori* specific antigen (acid glycine extract)

Strain: DSMZ 10242 (NCTC 11638)

Purification: Ultrasonication, centrifugation, filtration

Cultivation: Kelly-Medium

Introduction

Helicobacter pylori (previously *Campylobacter pylori*) is a micro-aerophilic, Gram negative, curved motile pathogen. It was first cultured by Marshall and Warren in 1983 from patients with gastritis. *H. pylori* is adapted to survive in the gastric acid and to escape the local immune response. Bacterial urease of *H. pylori* creates a local alkaline micro-environment. In addition *H. pylori* may produce various toxins.

H. pylori is the etiologic agent of chronic antral type B gastritis and involved in the pathogenesis of gastroduodenal ulcer disease and gastric carcinoma. This bacterium is only found in close association with inflamed gastric epithelium, usually in the gastric antrum and the first part of the duodenum. About 95% of patients with duodenal ulcer and 70-80% of those with gastric ulcer have *H. pylori* infection. 50% of patients with Non-Ulcer-Dyspepsie are associated with *H. pylori* infection. Several studies showed an association between *H. pylori* colonization and the development of gastric carcinoma. In Western countries around 70% of gastric cancer and in developing countries around 80% of gastric cancer could be attributed to infection with *H. pylori*. *H. pylori* affects about 5 - 15% below the age of 20 years and about 65% in advanced years. Nowadays *H. pylori* is uncommon in young children. This theory is based upon the assumption of a decreasing rate of infection in younger age cohorts in recent decades due to a rise in living standards. In the developing countries the infection rate is higher due to worse hygienic situations and a low socio-economic status.

H. pylori is believed to be transmitted orally. Many researchers think that *H. pylori* is transmitted orally by means of fecal matter through the ingestion of waste tainted food or water. There is also evidence that spread by fecal oral contact with infected persons is likely. Therefore the prevalence of *H. pylori* infection within a family community is clearly more often.

Principle of the WESTERN BLOT

The WESTERN BLOT may be used for the qualitative determination of human antibodies to *Helicobacter pylori* antigens.

For this Immunoblot an European strain of *Helicobacter pylori* (complete antigen) was treated with SDS and then electrophoretically separated in Polyacrylamide-gel according to molecular weight of the proteins. This was then transferred to Nitrocellulose (blotted) and cut into individual NTS.

The NTS were then incubated with blocking buffer.

For the assay the NTS are incubated with the control and the samples to be investigated, antibodies present will bind specifically to the protein bands and form antigen-antibody complexes. Unbound serum or plasma is removed by means of washing. During the second incubation Anti-human IgG or IgA Conjugate binds to the antibody-antigen complex. In the final wash step excess Conjugate is removed and SUBS|CH substrate is added to the chamber.

The specific protein bands appear as purple bands. The reaction is then stopped by the addition of distilled water and the NTS may be dried.

With the aid of a kit specific evaluation diagram the band pattern may be assessed and evaluated.

The interpretation of the band pattern provides evidence of the antibody response.

Materials required but not provided with the Kit

- Distilled water
- Pipettes
- Timer
- Measuring cylinder
- Tweezers
- Test tubes for sample- and conjugate dilution
- Water jet vacuum pump (to remove fluid from the incubation dish)
- Rocking platform or horizontal shaker

Kit contents ▽ 20 or ▽ 8

NTS	20 / 8	Nitrocellulose test strips with purified, separated <i>Helicobacter pylori</i> proteins
	3 / 1	Incubation dish with 8 chambers
WASHBUF 25x	25ml / 25ml	Wash solution concentrate (25x)
SPE DIL	2x21ml / 21 ml	Dilution buffer (with 0,05% microbial preservative) RTU
CONJ ALK 10x IgG IgA	2,3 ml / 1,0ml	Anti-human IgG or IgA Alkaline Phosphatase (sheep) (10x) (preservative: 0,049% Thimerosal)
CONTROL - 10x	0,5 ml / 0,4ml	Negative control, human (preservative: 0,095% sodium azid) (10x)
SUBS CH	21ml / 9ml	Chromogen-/ Substrat solution RTU
	1	Evaluation diagram with positive Control strip IgG
	1	Protocol sheet

Precautions

The WESTERN BLOT test is for IVD use only.

1. Do not mix lot specific reagents, such as NTS, Controls and CONJ|ALK|10x from different kit lots. The SUBS|CH doesn't have to be from the original test kit. But the lot of the SUBS|CH should be the same as indicated on the kit label. The SPE|DIL, the WASHBUF|25x can be used for all WESTERN BLOT tests irrespective of the lot and the nature of the WESTERN BLOT.
2. Seal all bottles properly after use in order to avoid bacterial contamination. All samples and kit components should be considered potentially infectious. All control samples have been tested for Hepatitis Bs antigen, anti-HIV I and II, anti-HCV and found to be negative.
3. The NTS are coated with inactive antigen. However, normal laboratory precautions should be maintained when handling with infectious material. Do not pipette by mouth.
4. Avoid contact with skin and mucous membranes when handling reagents, which contain preservatives (see kit contents). Wash thoroughly with water in case of contact and possibly look up a doctor.
5. Controls containing sodium azide may react with lead and copper plumbing, building explosive metal acids. Flush with sufficient water when disposing of reagents.
6. For disposal the legal regulations have to be followed.

Storage and stability

Store all reagents at \pm 2-8°C, protected from intense light. The expiration date of each component is indicated on the respective vial label. Do not use reagents beyond the expiration date.

The diluted WASHBUF is stable up to 4 weeks when stored at \pm 2-8°C.

Specimen collection and general handling

1. The assay procedure should be carried out only by qualified and well trained employees.
2. The instruction for use describes the applicable test method. In case of modification or applications others than the intended use, the user has to validate the procedure and take the responsibility for it.
3. Lipaemic, icteric, haemolysed or microbially contaminated specimen may cause interference.
4. Suitable specimens are serum or plasma (heparinized, EDTA, Citrat) samples obtained by standard laboratory techniques.
5. The samples should not be heat-inactivated since non-specific results may occur. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
6. For ethical reasons, the use of CSF samples was only evaluated by testing pairs of CSF and serum samples (only if available), distributed by the "Institut für Standardisierung und Dokumentation" (INSTAND) in Germany. Therefore the use of CSF samples should be proved by testing a sufficient number of samples.
7. Patient samples should be stored at \pm 2-8°C.
For long term storage \pm -20°C or lower is recommended.
8. **Note:** Diluted patient samples must be used on the same day.

Preparation of the test

Bring all reagents to room \pm * prior to use !

* room \pm up to maximally 25°C

WASHBUF : Dilute the WASHBUF|25x 1:25 with distilled water
e.g. add 10ml of WASHBUF|25x to 240 ml distilled water and mix well.

Control: Dilute the Negative Control 1:10 with Specimen diluent.
(900 μ l Specimen diluent + 100 μ l negative Control)

Dilution of samples: Dilute patient samples 1:101 with SPE|DIL
e.g. 10 μ l sample + 1000 μ l SPE|DIL; mix thoroughly.

Conjugate dilution: Dilute the [CONJ|ALK|10x] during the first wash step with [SPE|DIL] e.g. for 5 strips: 4,5ml [SPE|DIL] + 0,5ml [CONJ|ALK|10x] = 5ml Conjugate dilution

Please note:

- Carefully remove the [NTS] using tweezers, holding the strip by the numbered end.
- Close the tube immediately after taking the [NTS].
- The [NTS] should be used in number order from low to high.
- Lay the required number of [NTS], one per chamber of the incubation dish, placing them with the number facing up.
- Ensure that the [NTS] remain covered with fluid and that they do not dry out between the incubation or wash steps.

The [CONTROL-] should be used for both IgA and IgG.

WESTERN BLOT Assay procedure

Incubation at room T *

First incubation (sample incubation) 60 min.

Carefully pipette 1000 µl diluted Control or 1010 µl pre-diluted patient sample into the incubation chamber to coat the strip and incubate **60 min.** on the rocking platform.

First wash step

Completely remove patient samples (with the vacuum pump) and wash each strip **1 x** with **2ml** prepared [WASH|BUF] and immediately drain. Next wash the [NTS] a further **3 x** with **2 ml** [WASH|BUF] for **5 min.** each time. (Incubation on the rocking platform).

Second incubation (conjugate incubation) 30 min.

Completely remove the [WASH|BUF] and pipette **1 ml** pre-diluted [CONJ|ALK] in each chamber. Incubate for **30 min.** on the rocking platform.

Second wash step

(see first wash step)

Third incubation (Substrate incubation) 15 min.

Completely remove the [WASH|BUF] and pipette **1 ml** [RTU|SUBS|CH] in each well. Incubate from 10 min. to **15 min.** on the rocking platform. Remove the [SUBS|CH] completely from each compartment.

- Stop the enzyme-substrate reaction with **2x 2 ml** for 5 min. distilled water each.

Remove the [NTS] carefully from the compartment and dry completely on filter paper. The protein bands may be identified and evaluated with aid of the Evaluation diagram.

For the purposes of documentation the [NTS] should be kept dry and protected from the light.

Test results

Evaluation of the strips manuell:

Match the dry [NTS] at the edge of the protocol sheet and fix the [NTS] with tape or similar at the numbered ends of the [NTS].

The identification of the bands is possible with the positive control strip card. The immuno specific bands are signed on the positive control strip card.

The control card will be matched at the incubated fixed patient [NTS], the black line have to agree. Now it is possible to read directly the immuno specific bands.

Record the recognisable bands according to their molecular weight and intensity on the protocol sheet.

The control strip card is specific to each kit. All high specific and specific bands are signed on the control card.

Interpretation of result by using special Software (Seroline, Viro-Immun)

The result of a [NTS] can be interpreted by using a special software. Therefore dried and stained [NTS] should be fixed onto the protocol sheet which is included in the manual. It is recommended to glue the [NTS] (near the number of the strip) at the indication line of the protocol sheet.

The identification of each immuno reactive band is performed by the software program (please contact Viro-Immun for further assistance). The result including the interpretation will be printed together with the protocol sheet.

Note:

Every [NTS] has a reaction control. If the assay handled right, you can see on top of the [NTS] the purple coloured reaction control (see control strip) .

The with of the bands as well as their intensity are variable and depend on the concentration of the detected Helicobacter pylori in the sample.

The band pattern in the IgG determination is generally more intense and diverse than IgA.

Helicobacter pylori reactive proteins

Table 1

Molekular weight in kDa	Antigen	Specificity
>125		not specific
p120	Cag A (<i>Cytotoxin-associated-gene-A</i>)	high specific important pathogenicity factor for H. pylori, Ulcus marker
p117-91		not specific
p87	VacA (<i>Vacuolating-Cytotoxin-A</i>)	high specific for H. pylori, frequent common with CagA, Ulcus marker
p84-68		not specific
p66	UreB (<i>Big part of Urease</i>)	specific for H. pylori , marker for inflammation
p59	HspB (<i>Heat shock protein B</i>)	spezifisch for H. pylori, cross reaction to other heat shock proteins known
p55	FlaA (<i>Flagellin A-protein</i>)	specific for H. pylori
p50		specific for H. pylori
p37		specific for H. pylori
p33		high specific for H. pylori, functioning till now unknown
p29	UreA (<i>small part of Urease</i>)	specific for H. pylori , marker for inflammation
p24		high specific marker for pathogenicity, functioning till now unknown

Helicobacter pylori IgG/IgA:

Both the intensity and position of bands should be taken into consideration when assessing WESTERN BLOT bands.

The **Helicobacter pylori** antigens **IgG** and **IgA** may be divided in WESTERN BLOT into three classes:

- A** **unspecific antigen bands**
< 24kD / p68-p84kD / p91kD-p117kD / >125kD
- B** **specific antigen bands**
UreA p29kD / p37kD / p50kD / FlaA p55kD/ HspB p59kD / UreB p66kD
- C** **highly specific antigen bands**
CagA p120kD / **VacA** p87kD / p33kD / p24kD

negative - unspecific bands from A, weak antigen bands from B
- 3 specific antigen bands from B
- 1 highly specific band from C and 1 band from B

questionable - 4 specific antigen bands from B
- 1 highly specific antigen band from class C and 2 specific bands from B
- 2 clear highly specific bands from C

positive - 1 heavy and 1 further clearly highly specific band from C
- at least 2 clear antigen bands from C and 1 specific from B
- at least 1 clear band from C and at least 3 clear specific bands from B

unclear, weak bands should be not considered in evaluation.

Diagnostic Relevance and interpretation of results

- In the early phase of infection it could be happen that less antibodies will be detected, in this stage the test could be negative.
- If there is a clinical suspicion of Helicobacter infection and a negative or questionable test result, the tests should repeated after 2 weeks.

- A study shows that within the first weeks after treatment antibody titres had fallen by 20% – 30% irrespective of the success of bacterial eradication. In the bacteria-negative patients the decrease continued. 6 – 12 months after treatment the titre was 50% or less of pretreatment value. In patients who remained infected, the initial drops of antibody titres, if any, was followed by unchanged or slightly rising titres. IgA antibodies are valuable in patients who raise titres in this immunoglobulin class only.
- Seroconversion appears approximately 22 – 23 days after acute infection. For the interpretation of positive test results the clinical picture should always be taken into account. In case of a negative test result a florid H. pylori infection can almost be excluded. The majority of persons are infected lifelong but show no clinical symptoms.

IgG	IgA	Interpretation	Recommendation
-	-	no specific antibodies detectable,	For patients with increased risk of acute infection : monitoring examination.
+	+	acute or recent infection probable, In case of clinical symptoms treatment should be considered.	Monitoring of IgG, and IgA antibodies resp. use of other diagnostical parameters e.g. histological examination.
+- ++	-	single class IgG response or endemic infection titre In case of clinical symptoms treatment should be considered.	Monitoring of IgG, and IgA antibodies resp. use of other diagnostical parameters e.g. histological examination
-	+- ++	single class IgA response possible In case of clinical symptoms treatment should be considered.	Monitoring of IgG, and IgA antibodies resp. use of other diagnostical parameters e.g. histological examination

- Equivocal results** should be retested. Following the confirmation of the equivocal result the monitoring of the patient's antibodies is recommended in order to exclude unspecific reactions e.g. cross-reactivity, which may also cause equivocal results.

Note:

Reasons for **false negative results** are:

- low antibody response, 2. predominately development of IgA antibodies, 3. early stage of acute infection.

False positive results are based on cross reactions with e.g.: Campylobacter jejuni, E. coli, E. faecalis.

Performance Characteristics

Specificity / Sensitivity

31 samples IgG and 37 samples IgA were tested parallel in Western Blot Anti-Helicobacter IgG and IgA and comparison methods ELISA. The sensitivity and specificity are based on the results found.

Specificity: IgG 100% **Sensitivity:** IgG 90 %
Specificity: IgA 100% **Sensitivity:** IgA 94,1%

Cross-reactivity

- In the early infection phase there may be an insufficient number of antibodies and therefore a negative test result is possible.
- When there is a clinical suspicion of Helicobacter infection with a negative or questionable test result, a repeat test two weeks later is recommended.
- Antibiotic therapy may suppress the production of detectable antibodies in the early stages.
- The serological data should be taken into consideration with the clinical history for a full diagnosis. Where the results are questionable repeated testing is recommended.

Precision and reproducibility

Intra-assay reproducibility was determined by testing samples of different levels of antibody activities in one test run.

In determination of the samples there is no significant difference of detected antigen bands and their intensity.

Inter-assay reproducibility was determined by testing samples of different levels of antibody activities in different test runs.

In determination of the samples there is no significant difference of detected antigen bands and their intensity.

Internal quality control

The negative control controls should be carried out with every test run. Recommendation: For every new Lot, it is recommended to perform an internal quality control by testing one or more internal control samples which should be clearly specified.

Literature

- Haeckel R.: Helicobacter pylori Infektion. Teil 1: Epidemiologie, Pathobiochemie, Diagnostik und Therapie.
J Lab Med 1996; 20 (2) : 78-84
- Thomas, L.: Labor und Diagnose, Med. Verlagsgesellschaft Marburg 1995

Troubleshooting

ERROR	POSSIBLE CAUSES
no colourimetric reaction after addition substrate	no [CONJ]ALK pipetted, contamination of [CONJ]ALK (possibly with control sera during pipetting) may cause an inactivation.
generally too high reaction	incorrect [CONJ]ALK (i.e. not from original test kit), incubation time too long or incubation temperature too high, water quality for [WASHBUF] insufficient (low grade of deionization)
generally too low reaction	incorrect [CONJ]ALK (i.e. not from original test kit), incubation time too short, incubation temperature too low
false positive / negative samples	incorrect dilution of samples, lipaemic, haemolytic or icteric samples
unexplainable outliers	contamination of pipettes, tips or containers or with metals (iron, copper etc.),
high variation (from series to series)	incubation conditions not constant (time, temperature) high variation of room temperature, controls and samples are not carried out at same time (same intervals) check pipetting order, person related variation.
general source of error, that may leads to incorrect results	- surface damaging of [NTS] because of improper treatment - [NTS] dried out after washing (unreproducible results). - Reagents not pre-warmed to room temperature prior to use ([NTS])!. - Insufficient washing

The close observance of the test procedure will help to avoid these errors

WESTERN BLOT SHORT ASSAY PROCEDURE

Dilute **patient sample 1:101** :
10 µl patient sample + 1000µl [SPE]DIL.

Dilute **controls 1:10**:

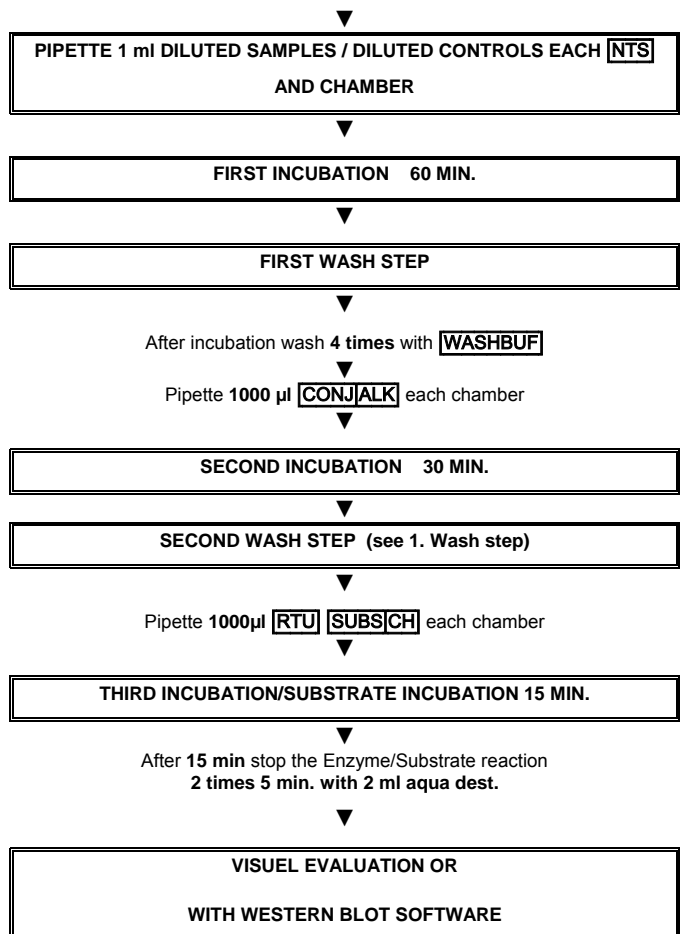
900µl [SPE]DIL + 100 µl control

Dilute [CONJ]ALK[10x] 1:10:

f.e: 4,5ml [SPE]DIL + 0,5 ml [CONJ]ALK[10x]

Take required [NTS] holding with tweezers by the numbered end out of the tube.

All incubations / wash steps on the rocking platform





VIRO-BLOT

ANTI – H. PYLORI - IgG/IgA

Gebrauchsanweisung

Immunoblot zur qualitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Helicobacter pylori in Humanserum und -Plasma

IgG [REF] BG 125/20 ▽ 20 [IVD] Komplette Testpackung
 IgG [REF] BG 125/8 ▽ 8 [IVD] Komplette Testpackung
 IgA [REF] BA 125/20 ▽ 20 [IVD] Komplette Testpackung
 IgA [REF] BA 125/8 ▽ 8 [IVD] Komplette Testpackung

Antigen-Bezeichnung

Antigen: H. pylori spezifisches Antigen (Saure Glycin Extraktion)

Stamm/Host: DSMZ 10242 (NCTC 11638)

Reinigung: Ultraschall, Zentrifugation, Filtration

Anzucht: Kelly-Medium

Einleitung

Helicobacter pylori sind spiralförmige, gramnegative, stäbchenförmige Bakterien die erstmalig 1983 von Marshall und Warren aus Patienten mit Gastritis isoliert wurden. Sie gaben den Bakterien wegen der biochemischen und morphologischen Ähnlichkeit mit Campylobacter und ihrer Ansiedlung im Antrum den Namen C. pylori, der 1989 offiziell in Helicobacter pylori geändert wurde.

Durch die Fähigkeit, Urease in großen Mengen zu produzieren, ist H.pylori in der Lage, das Säuregleichgewicht der Magenschleimhaut zu stören. Außerdem können diverse Toxine von H. pylori freigesetzt werden.

Die H. pylori-Infektion ist die weltweit am meisten verbreitete Erkrankung des Magen-Darmtrakts. H. pylori ist die Hauptursache für chronische Gastritis und ein großer Teil der Krankheiten die mit Magenentzündung assoziiert sind, sind auch mit H. pylori assoziiert.

Eine H. pylori -Infektion findet sich bei 95 % der Patienten mit Duodenal Ulkus und bei 70-80 % der Patienten mit Gastrischem Ulkus. 50 % der Nicht-Ulkus Dyspepsien sind mit H. pylori assoziiert. H. pylori -positive Individuen haben ein vierfach höheres Risiko einen peptischen Ulkus zu entwickeln, als solche die nicht infiziert sind. Studien haben die Präexistenz einer H. pylori-Infektion bei 90 % der Fälle mit Magenkrebs einschließlich Magen-Lymphom nachgewiesen. Das Risiko für auf H. pylori zurückzuführenden Magenkrebs liegt in den Industrieländern bei 70 % und 80 % in Entwicklungsländern.

In Industrienationen liegt die Seropositivität zwischen 5 - 15 % im Alter bis 20 Jahre und 65 % im Erwachsenenalter. Bei Kindern nimmt sie ab, was durch den Geburt-Kohorten Effekt erklärt wird. Dieser besagt, daß Personen, die in unterschiedlichen Perioden geboren wurden, unterschiedliche Prävalenzen für eine H. pylori-Infektion aufweisen.

Risikofaktoren für eine H. pylori-Infektion sind ein niedriger Sozial-Status und ärmliche Lebensbedingungen.

Die Übertragungswege einer H. pylori-Infektion sind allerdings noch nicht geklärt. Diskutiert werden oral-orale und fäkal-orale Übertragungswege. Die H. pylori-Infektion zeigt eine deutliche familiäre Häufung, was auf ein erhöhtes Risiko einer Mensch- zu-Mensch-Infektion innerhalb der Familiengemeinschaft hindeutet.

Testprinzip Western Blot

Der WESTERN BLOT dient der qualitativen Bestimmung humaner Antikörper gegen Helicobacter pylori Antigene. Für den vorliegenden Immunoblot wurde ein europäischer Stamm von Helicobacter pylori nach Behandlung mit SDS im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch nach Molekulargewichtgröße der Proteine aufgetrennt, anschließend auf Nitrocellulose transferiert (geblottet) und diese in einzelne [NTS] geschnitten. Die [NTS] wurden mit Blockingpuffer inkubiert.

Die [NTS] werden mit der Kontrolle bzw. den zu untersuchenden Proben inkubiert, vorhandene Antikörper binden sich spezifisch an die Proteinbanden und bilden einen Antigen-Antikörper-Komplex. Durch den anschließenden Waschprozeß werden ungebundene Probenanteile entfernt; während der zweiten Inkubation wird Anti-human IgG bzw. -IgA Konjugat an bereits gebundene Antikörper angelagert. Im anschließenden Waschprozeß wird überschüssiges Konjugat entfernt und danach [SUB|CH] in die Kammer pipettiert. Die spezifischen Proteinbanden werden als violette Banden sichtbar, die Reaktion wird mit aqua dest. gestoppt und die [NTS] getrocknet.

Mit Hilfe der beiliegenden kitspezifischen Auswerteschablone kann das detektierte Bandenmuster zugeordnet werden.

Die Interpretation des Bandenmusters läßt eine Aussage über die spezifische Antikörperantwort zu.

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind

- Aqua dest.
- Absaugvorrichtung zur Flüssigkeitsentfernung aus den Inkubationsschalen (z.B. Wasserstrahlpumpe)
- Taumler bzw. Horizontalschüttler
- Rührchen für Proben- und Konjugatverdünnung
- Pipetten - Meßzylinder
- Stoppuhr - Pinzette

Kitinhalt ▽ 20 oder ▽ 8

[NTS]	20 / 8	Nitrocellulose Teststrips mit gereinigten, aufgetrennten Proteinen von Helicobacter pylori
	3 / 1	Inkubationsschalen mit 8 Kammern
[WASHBUF 25x]	25ml / 25ml	Waschlösung-Konzentrat (25x)
[SPE DIL]	2x21ml / 21 ml	Probenverdünnungspuffer (KVM:0,05% Microbial Preservative), [RTU]
[CONJ ALK 10x] [IgG] [IgA]	2,3 ml / 1,0 ml	Antihuman IgG oder IgA Alkalische Phosphatase (vom Schaf) (10x) (KVM: 0,049% Thimerosal)
[CONTROL - 10x]	0,5 ml / 0,4ml	Negative Kontrolle, human (KVM: 0,095% Natriumazid) (10x)
[SUBS CH]	21ml / 9ml	Chromogen-/Substratlösung [RTU]
	1	Auswerteschablone mit positiven Kontrollstreifen
	1	Protokollblatt

KVM-Konservierungsmittel

Vorsichtsmaßnahmen

Der Test ist ausschließlich für [IVD] hergestellt.

1. Chargenspezifische Reagenzien wie [NTS], Kontrollen und [CONJ|ALK|10x] aus Kits unterschiedlicher Chargen nicht austauschen. [SUB|CH] muss chargenspezifisch, nicht aber kitspezifisch verwendet werden. [SPE|DIL] und [WASHBUF|25x] können bei allen WESTERN BLOT Testen chargen- und kitunabhängig verwendet werden.
2. Alle Fläschchen nach Gebrauch gut verschließen, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden. Alle Patientenproben und Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Kontrollen wurden auf HBs-Ag, HCV- und HIV 1 und 2 -Ak getestet und für negativ befunden.
3. Die [NTS] sind mit inaktiviertem Antigen beschichtet. Jedoch sollte auch hier auf die im Labor übliche Sorgfalt für das Arbeiten mit infektiösem Material geachtet werden.
4. Einige Reagenzien (siehe Kitinhalt) enthalten Konservierungsmittel. Der Kontakt mit Haut und Schleimhaut ist zu vermeiden. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
5. Das in den Kontrollen enthaltene Natriumazid bildet bei Kontakt mit Blei- und/ oder Kupferrohren explosive Metallazide, deshalb sollte bei deren Beseitigung mit reichlich Wasser nachgespült werden. S-Sätze: 26.1, 28.1 und S-46. Gefahrenhinweis: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken Arzt aufsuchen.
6. Zur Entsorgung sind die gesetzlichen Regelungen zu beachten.

Lagerung und Haltbarkeit

Alle Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern sowie vor direkter Sonneneinstrahlung zu schützen. Die Haltbarkeit der Reagenzien ist auf den Etiketten angegeben, nach Verfallsdatum sind diese nicht mehr zu verwenden. Die Gebrauchsverdünnung des [WASHBUF] ist bis zu 4 Wochen bei 2-8°C haltbar.

Allgemeine Hinweise

1. Testdurchführung muß durch ausgebildetes Fachpersonal erfolgen.
2. Die Gebrauchsanweisung enthält die Angabe über die Testmethode. Eine Modifikation oder andere Anwendung muß vom Anwender validiert werden und liegt in dessen Verantwortung.
3. Lipämische, ikterische, hämolytische oder bakteriell verunreinigte Proben können zu unzuverlässigen Testergebnissen führen.
4. Serum- oder Plasma- (Heparin, EDTA, Citrat) proben, die nach Standard-Labortechniken entnommen sind, sind zur Untersuchung geeignet.
5. Hitzebehandelte Proben dürfen nicht verwendet werden.
6. Die Verwendung von Liquor wurde aus ethischen Gründen nur an Ringversuchsmaterialien (wenn vorhanden) evaluiert. Die Verwendung sollte mit einer ausreichenden Anzahl von Patienten-proben vor der Anwendung im Labor geprüft werden.
7. Kurzfristige Lagerung der Proben bei 2- 8°C, eine längerfristige Lagerung wird bei -20°C empfohlen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.
8. **Hinweis:** In [SPE|DIL] verdünnte Proben müssen am gleichen Tag im Test eingesetzt werden.

Testvorbereitung

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur * bringen !

* Raumtemperatur bis maximal 25°C

[WASHBUF]: Das Konzentrat 1:25 mit aqua dest. verdünnen
 z.B. 10 ml [WASHBUF|25x] + 240 ml aqua dest.
 Lösung gut mischen!

Kontrolle: Die [CONTROL|-|10x] 1:10 mit [SPE|DIL] verdünnen.
 z.B. 900µl [SPE|DIL] + 100µl Kontrolle

Probenverdünnung: Alle Untersuchungsproben 1:101 mit [SPE|DIL] im Röhrchen vorverdünnen. z.B. 10 µl Probe + 1000 µl [SPE|DIL]. Die Verdünnung gut mischen!

Konjugatverdünnung: Die benötigte Menge [CONJ|ALK|10x] während dem ersten Waschschrift verdünnen. Das [CONJ|ALK|10x] wird 1:10 mit [SPE|DIL] verdünnt. Beispiel für 5 Streifen: 4,5ml [SPE|DIL] + 0,5ml [CONJ|ALK|10x] = 5ml Endvolumen.

Hinweis:

- Die [NTS] sollten vorsichtig mit der Pinzette an der Numerierung aus dem Röhrchen genommen werden.
- Das Röhrchen sofort nach Streifenentnahme wieder gut verschließen.
- Die [NTS] sollten entsprechend der Zahlenfolge verarbeitet werden.
- Die benötigte Anzahl [NTS] in je eine Kammer der Inkubationsschale legen; die [NTS] müssen so positioniert werden, daß die Zahlen nach oben zeigen.
- Außerdem ist darauf zu achten, daß die [NTS] stets mit Flüssigkeit bedeckt sind und zwischen den einzelnen Inkubations- bzw. Waschschrift nicht austrocknen.

Die im Kit enthaltene Kontrolle wird im IgG- sowie im IgA- Test als negative Kontrolle mitgeführt.

HELICOBACTER WESTERN BLOT Testdurchführung

Alle Inkubationen werden bei Raumtemperatur* durchgeführt.

- 1. Inkubation (Probeninkubation) 60 min.**
Die [NTS] werden mit 1000µl verdünnter Kontrolle und 1010 µl vorverdünnter Patientenprobe überschichtet und 60 min. auf dem Taumler inkubiert.
- 1. Waschschrift**
Nach vollständigen Absaugen der Proben werden die [NTS] 1 x mit je 1 ml hergestellter Waschlösung gewaschen und sofort wieder abgesaugt. Danach werden die [NTS] noch 3 x mit je 2 ml Waschlösung jeweils 5 min. gewaschen (Inkubation auf dem Taumler).
- 2. Inkubation (Konjugatinkubation) 30 min.**
Nach vollständigem Absaugen der Waschlösung 1 ml verdünntes Konjugat (alkalische Phosphatase Konjugat) in jede Kammer pipettieren. 30 min. auf dem Taumler inkubieren.
- 2. Waschschrift**
Siehe 1. Waschschrift.
- 3. Inkubation (Substratinkubation) 15 min.**
Nach vollständigem Absaugen der Waschlösung 1 ml [RTU|SUBS|CH] in jede Vertiefung pipettieren. Auf dem Taumler 15 min. inkubieren. [SUBS|CH] aus jeder Kammer vollständig abziehen.
- Die Enzym/Substratreaktion mit 2 ml aqua dest. 2 x 5min. abstoppen.

Die [NTS] werden vorsichtig aus der Kammer genommen und auf Filterpapier vollständig getrocknet, anschließend werden die Proteinbanden mit Hilfe der kitspezifischen Schablone identifiziert und ausgewertet. Zur Dokumentation der [NTS] sollten diese trocken und lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Beurteilung der Proben

Auswertung der Streifen manuell:

Die getrockneten [NTS] können auf dem beigefügten Protokollblatt an der Anlegekante angelegt werden. Die [NTS] sollten an der Numerierung mit Tesafilm oder einem anderen Klebstoff fixiert werden.

Die Identifizierung der immunspezifischen Banden ist mittels chargenspezifischer Kontrollstreifen-Karte möglich. Die immunspezifischen Banden sind am positiven Kontrollstreifen auf der Karte markiert und zugeordnet. Die Kontrollstreifen-Karte wird an die aufgeklebten entwickelten Patientenstreifen angelegt, die Markierungslinie des Patientenstreifens muß genau mit der Markierungslinie der Kontrollstreifen-Karte übereinstimmen. Die immunspezifischen Banden können nun direkt abgelesen werden.

Die erkennbaren Banden werden entsprechend ihres Molekulargewichts und ihrer Intensität auf dem Protokollblatt eingetragen.

Der Kontrollstreifen der Auswerteschablone ist immer chargenspezifisch.

Alle hochspezifischen und spezifischen Banden sind auf der Kontrollstreifen-Karte eingezeichnet

Auswertung der Streifen über Software (Seroline von VIRO-IMMUN): Die getrockneten [NTS] können auf dem beigefügten chargenspezifischen Protokollblatt an der Anlegekante angelegt werden. Die Strips sollten an der Numerierung mit einem Klebstoff fixiert werden.

Die Identifizierung der immunspezifischen Banden ist mittels der speziellen Software möglich, der Befund wird dann passend für das Protokollblatt ausgedruckt.

Hinweis zur Auswertung:

Jeder Nitrocellulosestreifen hat eine Reaktionskontrolle. Wenn der Test ordnungsgemäß nach Anleitung mit allen Komponenten durchgeführt wurde, erscheint am oberen Ende des Streifens die deutliche Bande der Reaktionskontrolle, siehe positiven Kontrollstreifen. Die Breite der Banden sowie deren Intensität sind unterschiedlich und hängen von der Konzentration der nachgewiesenen Helicobacter pylori Antikörper in der Probe ab. Das Bandenmuster im IgG - Nachweis ist meistens intensiver und vielfältiger als im IgA.

Helicobacter pylori immunreaktive Proteine

Tabelle 1

Molekulargewicht in kDa	Antigen	Spezifität
>125		nicht spezifisch
p120	Cag A (Cytotoxin-associated-gene-A)	Hochspezifisch , bedeutender Pathogenitätsfaktor für H. pylori, Ulcusmarker
p117-91		nicht spezifisch
p87	VacA (Vacuating-Cytotoxin-A)	hochspezifisch für H. pylori, tritt häufig mit CagA zusammen auf, Ulcusmarker
p84-68		nicht spezifisch
p66	UreB (große Untereinheit der Urease)	spezifisch für H. pylori, Entzündungsmarker
p59	HspB (Hitzeschockprotein B)	spezifisch für H. pylori, Kreuzreaktionen zu anderen Hitzeschockproteinen bekannt
p55	Fla A (Flagellin A-Protein)	spezifisch für H. pylori,
p50		spezifisch für H. pylori,
p37		spezifisch für H. pylori,
p33		hochspezifisch für H. pylori, Funktion noch nicht näher beschrieben
p29	UreA (kleine Untereinheit der Urease)	spezifisch für H. pylori, Entzündungsmarker
p24		hochspezifisch, Pathogenitätsfaktor , Funktion noch nicht bekannt

Helicobacter pylori IgG / IgA:

Bei der Beurteilung müssen Bandenposition (mittels Auswerteschablone) und Bandenintensität berücksichtigt werden.

Die **Helicobacter pylori** Antigene IgG / IgA lassen sich im WESTERN BLOT drei verschiedenen Klassen zuordnen:

- A** **unspezifische Antigenbanden**
< 24kD / p68-p84kD / p91kD-p117kD / >122kD
- B** **spezifische Antigenbanden**
UreA p29kD / p37kD / p50kD / FlaA p55kD/ HspB p59kD / UreB p66kD
- C** **hochspezifische Antigenbanden**
CagA p120kD / **VacA** p87kD / p33kD / p24kD

negativ

- unspezifische Banden aus A, schwache Banden aus B
- 3 spezifische Antigenbanden aus B
- 1 hochspezifische Bande C. und 1 spezifische Banden aus B

fraglich

- 4 spezifische Banden aus B
- 2 deutliche hochspezifische Banden aus C
- 1 hochspezifische Banden aus C und 2 spezifische Banden aus B

positiv

- 1 sehr starke und 1 deutliche hochspezifische Bande aus C
- 1 deutliche hochspezifische Antigenbande aus C und 3 spezifische Banden aus B
- 2 deutliche hochspezifische Antigenbanden aus C und 1 spezifische Bande aus B

Undeutliche, schwache Banden werden bei der Beurteilung nicht berücksichtigt.

Diagnostische Bedeutung und Interpretation der Ergebnisse

- In der frühen Infektionsphase kann es zu einer nicht ausreichend nachweisbaren Menge Antikörper kommen, in diesem Stadium kann ein negatives Testresultat nicht ausgeschlossen werden.

- Bei klinischem Verdacht einer Helicobacter Infektion und einem negativen bzw. fraglichen Testergebnis ist nach 2 Wochen eine Testwiederholung zu empfehlen.
- Der Nachweis positiver H. pylori Antikörper korreliert im hohen Maße mit einer Keimbeseidlung des Magens. Der **WESTERN BLOT ANTI-HELICOBACTER IgG/IgA** kann zum Antikörper Screening, aber auch zur Therapiekontrolle eingesetzt werden. Nach einer Therapie mit Antibiotika sinken in den ersten Wochen nach Beginn einer Keimeradikation die Antikörpertiter unabhängig vom Therapieerfolg um 20 - 30%. Erst bei längeren Verlaufsbeobachtungen (3-6 Monaten) lassen sich dann Patienten mit Heilung von Patienten mit weiter schwebender Infektion unterscheiden. Die Bestimmung von IgA-Antikörpern kann bei Patienten hilfreich sein, die keine IgG - Immunantwort zeigen.
- Eine Serokonversion tritt 22 - 23 Tage nach einer akuten Infektion ein. Positive Befunde sollten aber immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild interpretiert werden. Eine floride Infektion kann bei negativen Befunden weitgehend ausgeschlossen werden. Die meisten Menschen bleiben lebenslang infiziert, sind jedoch asymptomatisch.

IgG	IgA	Interpretation	Empfehlung
-	-	Keine spezifischen Antikörper nachweisbar	Bei Verdacht auf eine akute Infektion Kontrolluntersuchungen empfohlen
+	+	Akute oder vor kurzem erfolgte Infektion wahrscheinlich. Bei klinischen Symptomen sollte Behandlung in Betracht gezogen werden.	Kontrolluntersuchungen empfohlen, bzw. Einsatz weiterer diagnostischer Parameter zur Bestätigung der Infektion, z.B. histologischer Nachweis
+- ++	-	Reinklassiger IgG-Verlauf oder Durchseuchungstiters. Bei klinischen Symptomen sollte Behandlung in Betracht gezogen werden.	Kontrolluntersuchungen empfohlen, bzw. Einsatz weiterer diagnostischer Parameter zur Bestätigung der Infektion, z.B. histologischer Nachweis
-	+- ++	Reinklassiger IgA-Verlauf möglich. Bei klinischen Symptomen sollte eine Behandlung in Betracht gezogen werden.	Kontrolluntersuchungen empfohlen bzw. Einsatz weiterer diagnostischer Parameter zur Bestätigung der Infektion, z.B. histologischer Nachweis

- Fragliche Ergebnisse** sollten wiederholt werden. Um unspezifische Reaktionen (z.B. Kreuzreaktionen), die auch zu einem fraglichen Ergebnis führen können auszuschließen, empfehlen wir bei Bestätigung des grenzwertigen Testergebnisses eine Verlaufskontrolle.

Hinweis:

Ursachen **falsch negativer Ergebnisse** sind:

- geringer Antikörper Respons, 2. vorwiegende IgA-Antikörper-Bildung und 3. frische Infektion.

Falsch positive Ergebnisse beruhen auf Kreuzreaktionen, z.B.: mit Campylobacter jejuni, E. coli, E. faecalis.

Leistungsdaten

Spezifität / Sensitivität

Es wurden im Western Blot 31 Proben Helicobacter IgG und 37 Proben im Helicobacter IgA parallel im ELISA getestet. Die Angaben zur Sensitivität und Spezifität des Western Blots beziehen sich auf diese Ergebnisse.

Spezifität: IgG 100% **Sensitivität:** IgG 90%
Spezifität: IgA 100% **Sensitivität:** IgA 94,1%

Kreuzreaktionen

- In der frühen Infektionsphase kann es zu einer nicht ausreichend nachweisbaren Menge Antikörper kommen, in diesem Stadium kann ein negatives Testresultat nicht ausgeschlossen werden.
- Bei klinischem Verdacht einer Helicobacter Infektion und einem negativen bzw. fraglichen Testergebnis ist nach 2 Wochen eine Testwiederholung zu empfehlen.
- Eine Antibiotikatherapie kann im Frühstadium die Bildung von nachweisbaren Antikörpern unterdrücken.
- Bei der Diagnose sollten serologische Daten generell im Zusammenhang mit dem klinischen Bild gesehen werden. Sind Untersuchungsergebnisse fraglich, wird eine erneute Testung empfohlen.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die intraserielle Präzision (Intraassay) wurde mittels unterschiedlich reaktiver Proben im Mehrfachansatz innerhalb einer Western Blot Charge ermittelt.

Bei der visuellen Auswertung wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der detektierten Antigenbanden und deren Intensität festgestellt. Für die Bestimmung der interseriellen Reproduzierbarkeit (Interassay) wurden unterschiedlich reaktive Proben in unabhängig voneinander durchgeführten Testläufen ermittelt.

Bei der visuellen Auswertung wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der detektierten Antigenbanden und deren Intensität festgestellt.

Interne Qualitätskontrolle (Validität)

Die negative Kontrolle sollte bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Empfehlung (nach MPBetriebsV): Bei jeder neuen Kit-Charge eine interne Qualitätskontrolle durchführen, z.B. durch Testung einer oder mehrerer interner Kontrollproben, welche klar spezifiziert sein müssen.

Literatur

- Haeckel R.: Helicobacter pylori Infektion. Teil 1: Epidemiologie, Pathobiochemie, Diagnostik und Therapie. J Lab Med 1996; 20 (2) : 78-84
- Thomas, L.: Labor und Diagnose, Med. Verlagsgesellschaft Marburg 1995

Problemlösungen/Troubleshooting

FEHLER	Mögliche Ursachen
keine Farbreaktion nach Substratzugabe	Kein [CONJ ALK] pipettiert oder Kontamination des [CONJ ALK]. Verunreinigung (kann zur In-aktivierung führen), keine Probe pipettiert
insgesamt zu schwache Reaktion	Falsches [CONJ ALK]. Inkubationszeit zu kurz oder zu niedrige Inkubationstemperatur, Proben während der Inkubationszeit nicht ausreichend in Bewegung (Taumler!)
insgesamt zu starke Reaktion	Falsches [CONJ ALK]. Inkubationszeit zu lang oder zu hohe Inkubationstemperatur, Wasser für [WASHBUF] nicht ausreichend entionisiert
falsch positive / negative Probe	Falsche Probenverdünnung, Probe lipämisch, ikterisch oder hämolytisch
starke Schwankungen (von Serie zu Serie)	Schwankungen bei der Inkubationstemperatur und -zeit. Kontrollen und Proben nicht gleichzeitig (gleiche Intervalle) angesetzt, [NTS] nach dem Waschen ausgetrocknet.
allgemeine Fehler-quellen, die zu falschen Ergebnissen führen	- Beschädigung der Membranoberfläche durch unsachgemäße Behandlung der [NTS]. - Reagenzien oder [NTS] nicht auf RT gebracht - Verunreinigungen v. z.B. Pipetten, -spitzen, Gefäße, - ungenügender Waschvorgang

Durch konsequente Einhaltung der Testvorschrift können diese Fehler vermieden werden

WESTERN BLOT KURZTESTDURCHFÜHRUNG

Alle **Untersuchungsproben 1:101 verdünnen:**

10 µl Probe + 1000µl [SPE|DIL].

Kontrollen 1:10 verdünnen:

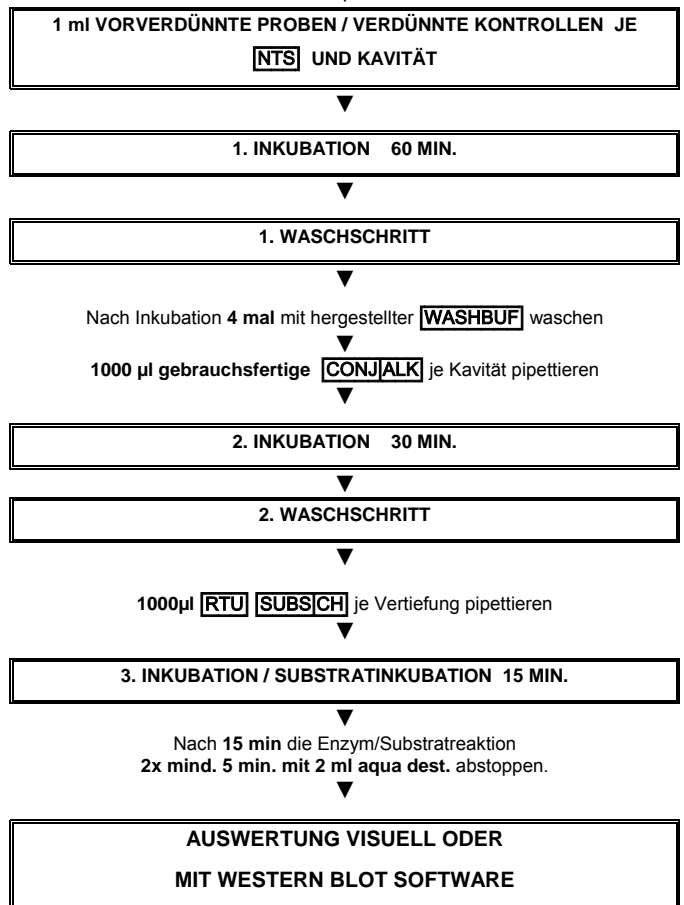
900µl [SPE|DIL] + 100 µl Kontrolle

[CONJ|ALK|10x] 1:10 verdünnen:

z.B: 4,5ml [SPE|DIL] + 0,5 ml [CONJ|ALK|10x]

Benötigte Anzahl [NTS] nur an den Enden mit einer Pinzette aus dem Röhrchen entnehmen.

Alle Inkubationen / Waschschritte auf dem Taumler durchführen.



: Viro-Immune Labor-Diagnostika GmbH, In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12 email: info@viro-immune.de



Symbole nach IVD/ symbols used with IVD devices/ Symbole / Símbolos / Simboli / Simbolos /Symboly IVD

NTS	Nitrocellulose Teststrips/ Nitrocellulose test strips/ Bandalette Nitrocellulose/Tiras test de nitrocelulosa / strips innitrocellulosa/ Tiras teste Nitrocelulose/Nitrocelulózové testovací proužky
SPE DIL	Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Ředici pufr
WASHBUF 25x	Waschlösung/ wash solution/ solution de lavage/ solución limpiadora/ soluzione lavaggio/ solução de lavagem/ Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 25x/ Promyvaci pufr 25x koncentrovany
CONJ ALK 10x	Alkalische Phosphatase Konjugat / Alkaline Phosphatase conjugate / Conjugué enzymatic marqué à la phosphatase alcaline/ conjugado de fosfatasa alcalina/ fosfatasi alcalina coniugata/ fosfatase alcalina conjugado/ Alkalická fosfataza konjugat
SUBS CH	Chromogen-Substrat / Chromogen substrate / substrat Chromogen/ substrato Chromogen/Chromogeni substrat
CONTROL + 5x	Positive Kontrolle/ positive control/ Contrôle positif/ control positivo/ controllo positivo/ controle positivo Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 5x/Pozitivni kontrola
CONTROL - 5x	Negative Kontrolle/ negative control/ Contrôle négatif/ control negativo/ controllo negativo/ controle negativo Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 5x/Negativni kontrola
REF	Artikel Nr./ reference or order number/ Référence ou numéro de commande/ referencia o número de pedido/ codice di riferimento o di commissione/ referência ou número de encomenda/Výrobní číslo
RTU	gebrauchsfertig/ ready to use/ Prêt à l'emploi/ liso para su uso/ pronto per l'uso/ pronto para usar/Přímó k použití
LOT	Charge/ lot/ Lot/ lote/ carcia/ lote /Šarže
IVD	In-vitro-Diagnostikum/ in vitro diagnostic/ Diagnostic in vitro/ diagnóstico in-vitro/ In-vitro diagnostic/ diagnóstico In-vitro/ In vitro diagnostika
▼ 20	20 Bestimmungen/ tests/ testés/ determinazioni/ testes/20 stanovení
📖	Gebrauchsanweisung beachten/ consult instructions for use/ consulter le mode d'emploi/ consultar las instrucciones de uso/ consultare le istruzioni per l'uso/ consultar instruções de uso
↕	Temperaturgrenzen/ temperature limitation/ Limites de température/ Limites de temperatura/ Limiti di temperatura/ Limites de temperatura/Limitující teplota
🕒	Verfallsdatum:/ expiry date/ date d'expiration/ Fecha de caducidad/ Data di decadenza/ Limite de validade/Doba použití
🏭	Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/Vyrobeno v

