

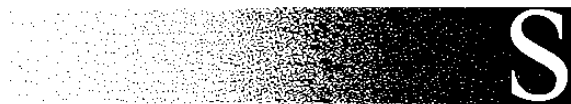
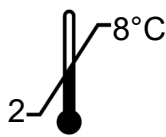
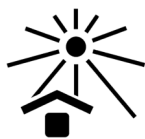
**ELISA**  
zur Bestimmung von  
Antikörpern (IgG) gegen  
**Helicobacter pylori**

**Gebrauchsinformation**

**REF** 0112FE00.FWD  12 x 8 Bestimmungen

**IVD**

**CE**



**STEFFENS** BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH

Baumgartenstr. 5  
D-79285 Ebringen (FRG)  
Tel./Fax: +49 7664 60025-4 / -5  
Email: [info@steffens-biotec.com](mailto:info@steffens-biotec.com)

## **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
  - 8.1. Manuelle Durchführung
  - 8.2. 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 IgG
  - 11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
12. Garantie und Haftung
13. Symbole
14. Literatur
15. Kurzanleitung

Das hier beschriebene Produkt entspricht den Anforderungen der IVD-Direktive 98/79/EG.

Dokument Id.-No. / Version: 0112FE30.FWD.doc / 2018-07-06

## 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, IgG-Antikörper gegen *H. pylori* in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) zu messen. 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. Er darf nur von geschultem Personal eingesetzt werden.

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

Als antimikrobielles Reagenz enthalten Probenpuffer, Standards und Kontrollen N-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 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, ebenso wie die Proben (und Reste von ihnen); gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

### **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-IgG 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 IgG 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.

<b>MWP</b>	<b>12x8</b>
------------	-------------

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

<b>BUF</b>	<b>SPL</b>
------------	------------

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

<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>10x</b>
------------	-------------	------------

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

<b>CAL</b>	<b>1-6</b>
------------	------------

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

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>	<b>CONTROL</b>	<b>+</b>
----------------	----------	----------------	----------

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

<b>CONJ</b>	<b>IgG</b>
-------------	------------

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>
-------------	------------

- h. Stopplösung (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.

<b>SOLN</b>	<b>STOP</b>
-------------	-------------

- 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  $\mu\text{L}$  (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. Wird der Kit in mehreren Portionen verwendet, sollten nur die für den aktuellen Test benötigten Volumina den verschiedenen Fläschchen entnommen werden. Dabei ist **ganz wichtig**, dass es zu keinerlei Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien kommt! Nur saubere Pipetten verwenden; Reagenzienreste **nicht** in die Original-Fläschchen zurückgeben.

- 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: Patientenserum als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben. Neben Serum ist auch EDTA-, Citrat- oder Heparin-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet.

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

Die Proben 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. Auftaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

## 8. Durchführung des Tests

### 8.1. Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur (23 ± 3°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  $\mu\text{L}$  Konjugat (14 mL, gebrauchsfertig, rot) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.
- e. Waschschritt c wiederholen.
- f. Je 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $2 - 8^\circ\text{C}$  lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

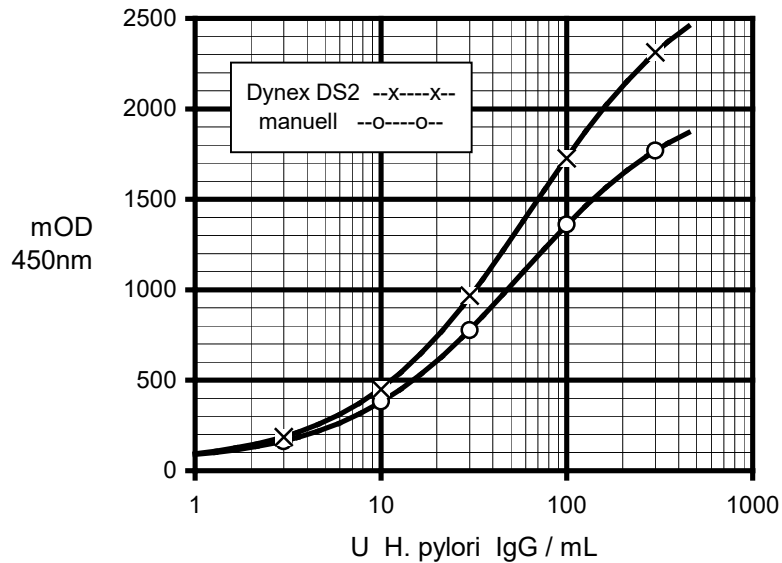
## 8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine Beschreibung des Programmablaufs für die Assay-Durchführung und -Auswertung kann als pdf-Datei 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.





0112FE00.FED/StdKurveV0810J

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

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 IgG 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 Chargenspezifischen 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 IgG / mL Probe	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 10,0	< 0,83
cut-off	13,0	1,00
grenzwertiger Bereich	10,0 - 16,9	0,83 - 1,19
positiver Bereich	> 16,9	> 1,19

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 IgG-Antikörpern gegen H. pylori aufweist. Dies schließt die Möglichkeit einer frischen Infektion jedoch nicht aus. Sind klinische Anzeichen einer Infektion erkennbar, könnten IgM- oder IgA-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 IgG-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 IgG-Antikörper nach, die gegen *H. pylori* gerichtet sind.

#### 11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

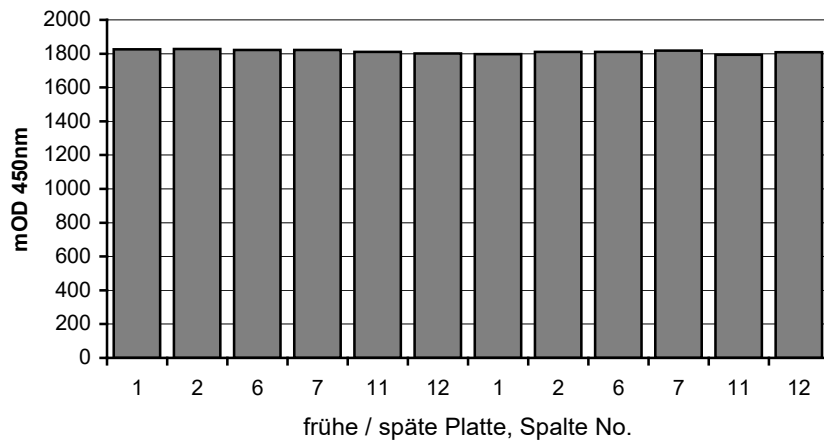
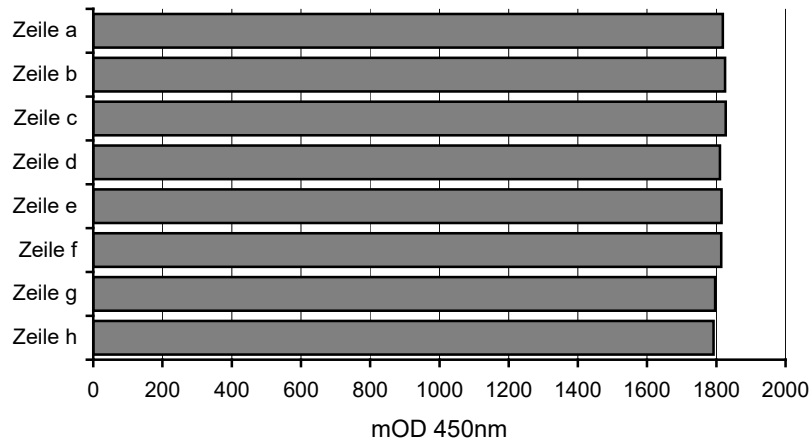
Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu < 1 U H. pylori IgG / mL Probe bestimmt (n = 24).

Empfohlener Messbereich: 2 - 200 U H. pylori IgG / mL Probe.

#### 11.4. Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer 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: 12011).

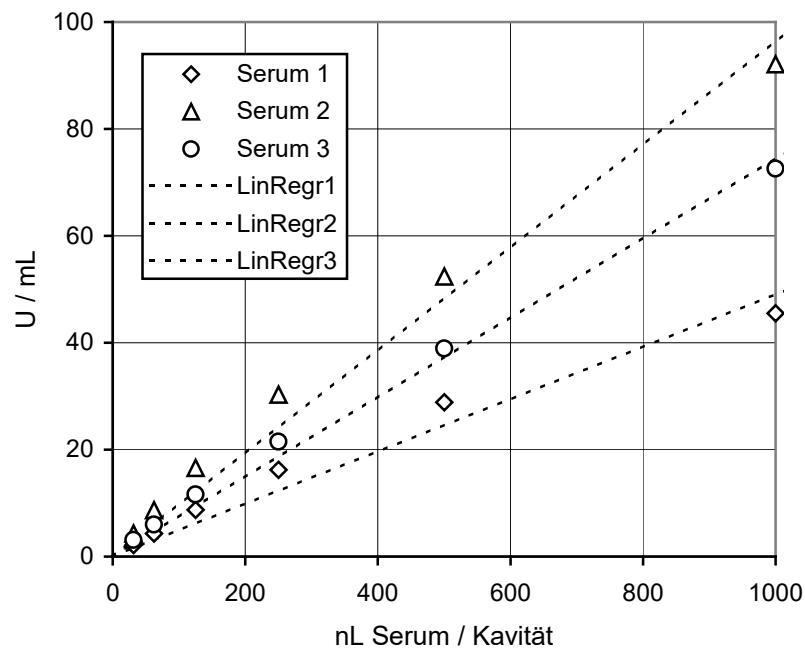
Platte	früh (n/10)						spät (9n/10)						MW	VK %
	Spalte	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11		
Zeile a	1843	1836	1802	1815	1835	1813	1793	1817	1812	1810	1827	1819	1819	0,8
Zeile b	1825	1828	1828	1844	1826	1817	1810	1821	1805	1838	1817	1845	1825	0,7
Zeile c	1833	1836	1843	1843	1837	1820	1806	1830	1831	1834	1797	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	<b>1813</b>	
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		<b>1,1</b>



0112FE00.FED/FphHomV0810J

### 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.



0112FE00.FED/LinearV0810J

### 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	23	3,3	3,5
2	41	2,4	3,2
3	83	4,0	5,2

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

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	26	1,8
2	44	3,6
3	92	5,1

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

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	21	1,6
2	41	4,8
3	90	4,6

11.7. Häufigkeitsverteilung von H. pylori IgG

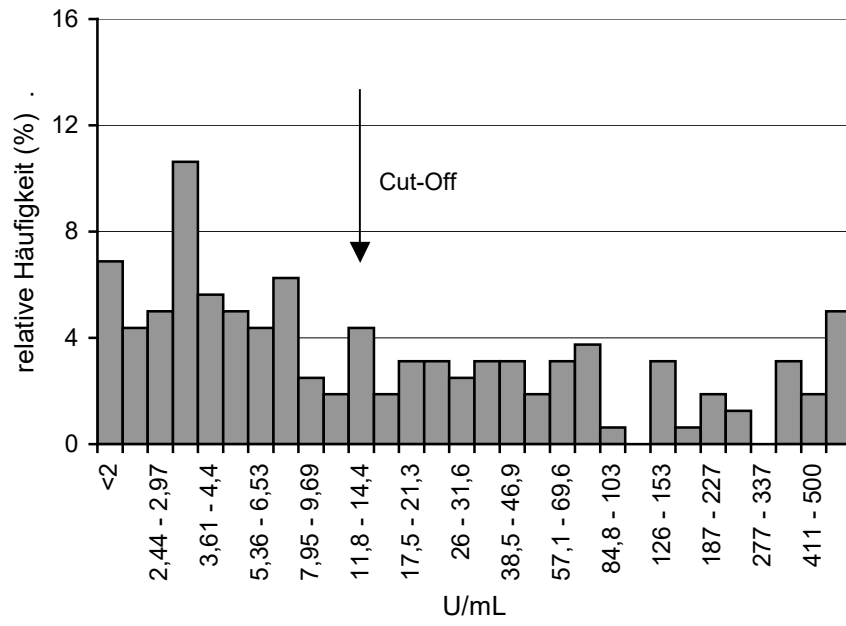
Diese wurde bestimmt in einem Blutspender-Serenkollektiv, gleichmäßig nach Alter und Geschlecht verteilt, und in einem Serenkollektiv, das positiv in einem CE-konformen Referenz-ELISA gefunden worden war. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

Blutspender-Seren		positive Seren	
n:	160	n:	77
MW:	80 U/mL	MW:	230 U/mL
MW + s:	250 U/mL	MW - s:	4,6 U/mL
MW + 2s:	410 U/mL	MW - 2s:	< 0 U/mL
Median:	9,4 U/mL	Median:	140 U/mL
95. Perzentile:	490 U/mL	5. Perzentile:	26 U/mL

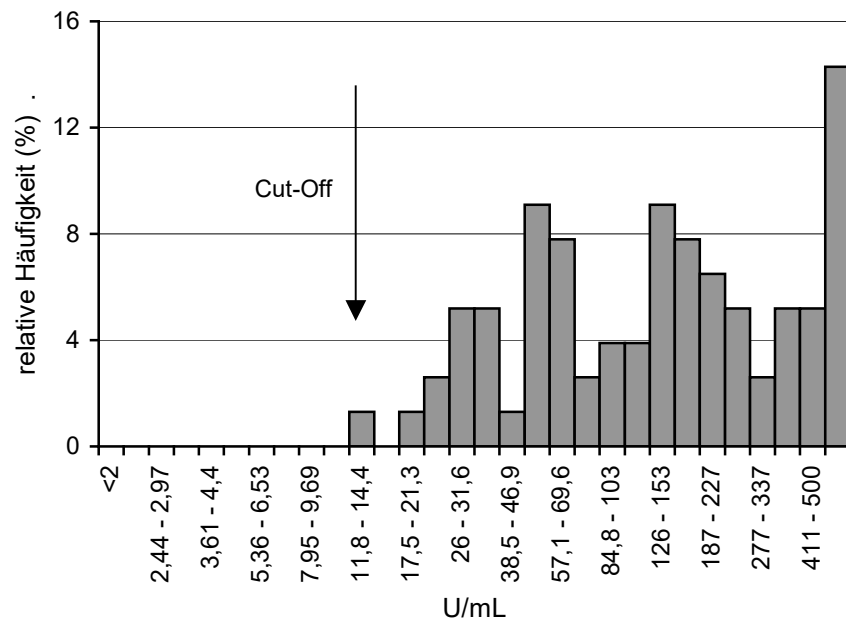
Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 13,0 U/mL bestimmt (5). Mit dieser Definition wurde das gesamte Referenz-Kollektiv positiv gefunden; das schwächste Serum liegt gerade über dem cut-off. Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von ca. 55 bzw. annähernd 100 %.

Der niedrige Spezifitäts-Wert spiegelt die bekannte Prävalenz der H. pylori-Infektion wider, die stark von der untersuchten Population abhängt und mit ihrem Alter zunimmt; eher als eine Spezifitäts-Schwäche des ELISAs. Prävalenzwerte von 25 bis zu 60 % wurden für Industriestaaten veröffentlicht. Damit übereinstimmend wurden mit dem genannten cut-off 45 % des obigen Blutspenderkollektivs positiv gefunden (s.u.).

### Blutspender-Seren



### Positiv-Seren



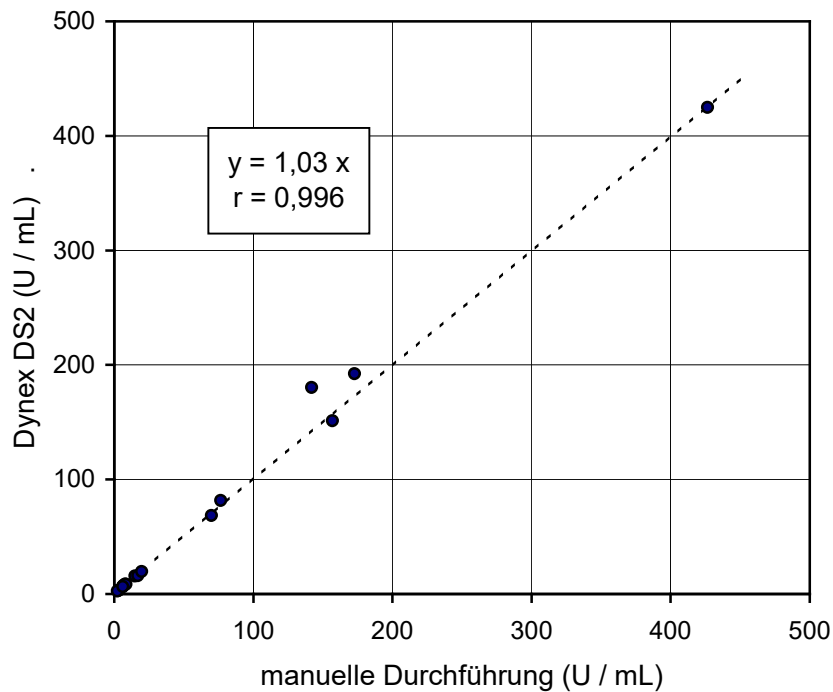
0112FE00.FED/HaufgPlotV0810J

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 = 3,1 %	mittl. VK = 3,4 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 4,5 %	mittl. VK = 3,8 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



0112FE00.FED/Korr/DynexDS2-V0810J



## 12. Garantie und Haftung

Steffens biotechnische Analysen GmbH (SBA) 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 SBA jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann SBA keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

## 13. Symbole



Artikel-Bezeichnung



Chargen-Bezeichnung



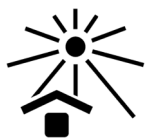
Enthält x Bestimmungen



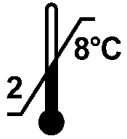
Für *in vitro* diagnostische Anwendung



Conformité Européenne



Lichtgeschützt aufbewahren



Bei 2 - 8°C lagern



Verfallsdatum



“Gebrauchsinformation” lesen



Warnung



Biologisches Risiko



Hergestellt von

## 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 Proben 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  $\mu$ L Waschpuffer waschen. Dann je 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L Waschpuffer waschen.
- e. Je 100  $\mu$ L des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, rot) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100  $\mu$ L des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100  $\mu$ L 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/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.