

RIDA® LINE Helicobacter IgA, IgG

Art. Nr.: LB2313 (IgA)
LB2323 (IgG)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Allgemeines

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDA® LINE Helicobacter ist ein qualitativer Line-Immunoassay zum Nachweis und zur Identifizierung von Antikörpern (IgA, IgG) gegen *Helicobacter pylori* in humanem Serum oder Plasma.

Im Unterschied zum ELISA erlaubt der Test durch die getrennte Betrachtung der Einzelantigene die Identifizierung von spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Antigene von *Helicobacter pylori*.

Durch die Verwendung von typspezifischen Antigenen kann zusätzlich zwischen einer Infektion mit Typ I und Typ II differenziert werden.

Der RIDA®LINE IgA, IgG ist ein Bestätigungstest und kann zur Abklärung von unklaren Screening-Ergebnissen eingesetzt werden.

2. Einleitung

Erste Beschreibungen von spiralförmigen Organismen im menschlichen Magen datieren schon aus der Zeit um die Jahrhundertwende. Die kulturelle Anzuchtung aus einem Patienten mit chronisch aktiver Gastritis und damit die eingehende Beschreibung gelang Marshall und Warren Anfang der achtziger Jahre. Die spiralförmigen Bakterien werden vor allem auf der Schleimhaut des Antrums gefunden. Der zunächst vorgeschlagene Name *Campylobacter pyloridis* bzw. *pyloris* wurde schließlich nach Schaffung einer eigenen Gattung *Helicobacter* in *Helicobacter pylori* geändert.

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, spiralförmiges Bakterium mit bis zu drei Windungen. Wie alle Vertreter der Gattung *Helicobacter* besitzt auch *Helicobacter pylori* Flagellen (unipolar, 2 - 6 Flagellen). Eine sichere Identifizierung bei entsprechender Kulturmorphologie ist die außergewöhnlich starke Ureasereaktion sowie der positive Nachweis von Katalase und Oxidase. Unterschiedliche *Helicobacter pylori* Isolate zeigen zwar eine hohe genetische Variabilität, ihre phänotypischen Charakteristika sind jedoch weitgehend gleich. Die einzigen derzeit bekannten phänotypischen Unterschiede beschränken sich auf die Produktion bzw. Nichtproduktion eines vakuolisierenden Zytotoxins VacA und eines damit assoziierten Proteins CagA. Aufgrund dieses Unterschiedes werden klinische Isolate in zwei Typen eingeteilt. *Helicobacter pylori*-Stämme vom Typ I besitzen die Fähigkeit zur Produktion dieser Proteine. Zum Typ II gehören alle übrigen Stämme, denen diese Fähigkeit fehlt. Auffälligerweise sind Patienten mit Duodenalulzera wesentlich häufiger mit dem VacA und CagA exprimierenden Typ I infiziert, was darauf hindeutet, dass Typ I-Infektionen zu ernsthafteren Krankheitsverläufen führen. Diese klinischen Befunde werden unterstützt durch die Beobachtung, dass Lysate von *Helicobacter pylori* Typ I oder auch gereinigtes VacA Magenschädigungen bei Mäusen hervorrufen können. Es ist noch nicht geklärt, wie *Helicobacter pylori* übertragen wird. Vermutlich handelt es sich um einen oral-oralen oder fäkal-oralen Übertragungsweg. *Helicobacter pylori* steht in ursächlichem Zusammenhang mit nahezu allen Duodenal- und Magenulzera, sowie MALT-Lymphomen des Magens und ist mit einem erhöhten Risiko für Magen-Adenokarzinome

assoziiert. *Helicobacter pylori* wurde von der WHO als Karzinogen der Gruppe 1 klassifiziert. Etwa 50% der Weltbevölkerung sind infiziert, wobei die Prävalenz in den Industrieländern, im Gegensatz zu den Entwicklungsländern, mit zunehmendem Alter nur langsam steigt. Infektionen erfolgen in den Entwicklungsländern meist in der Kindheit und persistieren über Jahrzehnte. Obwohl alle *Helicobacter pylori*-infizierten Personen histologisch eine Gastritis entwickeln, führt dies nur bei etwa 10% zu ernsthaften Erkrankungen wie peptischen Ulzera, Magenkarzinomen oder MALT-Lymphomen. Als Ursache werden neben den unterschiedlich virulenten Stämmen vom Typ I und II auch Wirtsfaktoren diskutiert.

Bei der Diagnostik lässt sich grundsätzlich zwischen invasiven und nicht invasiven Methoden unterscheiden. Bei der invasiven Methode wird der histologische Nachweis des Keimes aus einem gastroscopisch gewonnenen Biopsat mit einem Nachweis der Ureaseaktivität des Keimes im Biopsiematerial gekoppelt. Es kann sich eine kulturelle Anzucht anschließen. Die Gastroskopie ist sehr häufig zum Ausschluss eines Karzinoms, aber auch aus therapeutischen Gründen (z. B. Stillen von Blutungen) notwendig. Mit einer Gastroskopie alleine kann jedoch keine *Helicobacter pylori* Infektion nachgewiesen oder ausgeschlossen werden. Die Biopsie birgt die Gefahr falsch negativer Ergebnisse, da Material an Stellen des Magens entnommen werden kann, an denen keine Besiedlung mit *Helicobacter pylori* vorliegt.

Die nicht invasive Diagnostik über die Identifizierung von Serumantikörpern mittels Enzymimmunoassay oder Western bzw. Line Blot gewinnt wegen ihrer Vorteile für den Patienten zunehmend an Bedeutung. Dabei zeichnet sich der Enzymimmunoassay durch seine einfache Handhabung als Screening-Methode aus. Der Line Blot bietet zusätzlich den Vorteil, zwischen *Helicobacter pylori* vom Typ I und Typ II differenzieren zu können. Durch die Auftrennung der Antigene lassen sich die gegen sie gerichteten Antikörper isoliert identifizieren und so Rückschlüsse auf das Vorhandensein von VacA und CagA ziehen. Hierdurch wird eine Analyse der in ihrer klinischen Bedeutung unterschiedlichen Typen von *Helicobacter pylori* möglich.

Die Eradikation von *Helicobacter pylori* durch eine kombinierte Antibiotikatherapie kann die Gastritis heilen und ebenfalls zu einer beschleunigten Abheilung eines Ulkus führen. Nur wenn *Helicobacter pylori* als Ursache des Ulkus eradiziert wurde, blieben die geheilten Ulzera auch in Remission.

3. Testprinzip

Für den vorliegenden Lineblot wurden hochgereinigte rekombinante *Helicobacter pylori*-Antigene (CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC, gGT) auf eine Nitrocellulose-Membran fixiert. Diese Teststreifen werden mit der zu untersuchenden Probe (Serum, Plasma) inkubiert, wobei sich spezifische Antikörper an die Antigene der Erreger anlagern. Nach Beseitigung ungebundener Antikörper durch Waschen der Streifen werden in einer zweiten Inkubation mit anti-human IgA- oder IgG-Konjugat und anschließender Farbreaktion spezifisch gebundene Antikörper gegen die verschiedenen Antigene von *H. pylori* als dunkle Banden auf den Streifen sichtbar.

4. Packungsinhalt

Tabelle 1: Packungsinhalt

(Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen)

			LB2313 IgA	LB2323 IgG
Strip	20	2 x 10 Teststreifen (durchnummeriert); beschichtet mit H. pylori-Antigenen	X	X
Wash/Diluent 10x	100 ml	Wasch- / Verdünnungspuffer; Phosphat-Puffer; enthält NaCl, KCl und Detergenz Konservierungsmittel MIT (0,1%) und Oxyprion (0,2%)	X	X
MP	5 g	Milchpulver; aus Magermilch	X	X
Conjugate IgA 100x <i>farbloser Deckel</i>	500 µl	Anti-human-IgA-Konjugat (Kaninchen); 100fach konzentriert; Peroxidase-konjugierter Antikörper; enthält < 0,1% NaN ₃ , MIT (<0,1%), Chlorazetamid (<0,1%)	X	
Conjugate IgG 100x <i>grüner Deckel</i>	500 µl	Anti-human-IgG-Konjugat (Kaninchen); 100fach konzentriert; Peroxidase-konjugierter Antikörper; enthält < 0,1% NaN ₃ , MIT (<0,1%), Chlorazetamid (<0,1%)		X
Substrate	40 ml	Chromogenes Substrat; gebrauchsfertig; enthält Tetramethylbenzidin	X	X
Auswertebogen	1		X	X

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Reagenzien

- deionisiertes Wasser

5.2. Zubehör

- Inkubationswannen (bei Bedarf bitte unter Art. Nr. LB0003 bestellen)
- Absaugpumpe zum Entfernen der Flüssigkeit aus den Inkubationswannen
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mixer
- Mikropipetten für Volumina von 20 µl und 1000 µl
- 10 ml Pipette
- Messzylinder, 50 ml und 1000 ml
- Plastikpinzette zum Anfassen der Teststreifen

6. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem und autorisiertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Nach der Zugabe von Patienten- oder Kontrollmaterial müssen die Streifen und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, als potenziell infektiös betrachtet und entsprechend den jeweiligen nationalen Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Die Reagenzien enthalten Natriumazid, MIT (Methylisothiazolon), Oxypyryon, Chlorazetamid und Wasserstoffperoxid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden. Natriumazid kann bei Kontakt mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Kreuzkontaminationen der Patientenproben oder Konjugate können zu falschen Testergebnissen führen.

7. Reagenzien/Kitkomponenten und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern (**nicht einfrieren**) und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Die Reagenzien Substrat, Waschpuffer und Konjugat können chargenübergreifend eingesetzt werden. Dabei ist die Haltbarkeit dieser Komponenten zu beachten. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden.

Die konzentrierten Konjugate sind jeweils unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Der verdünnte Wasch- / Verdünnungspuffer ist geruchlos und leicht getrübt und kann bei einer Lagerung bei 2 – 8 °C vier Wochen verwendet werden.

Die Röhrchen mit den Teststreifen sind erst unmittelbar vor Gebrauch zu öffnen um Kondenswasserbildung zu vermeiden. Nicht benötigte Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei 2 – 8 °C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).

Die Kitkomponenten müssen während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht geschützt werden. Insbesondere die Substratlösung ist lichtempfindlich.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Eine bläulich gefärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

9. Sammlung und Lagerung der Proben

Der RIDA® LINE Helicobacter kann mit Serum oder Plasma durchgeführt werden. Die Verwendung von hitzeinaktivierten, ikterischen, hämolysierten lipämischen oder trüben Proben wird nicht empfohlen. Mikrobielle Kontamination ist unbedingt zu vermeiden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird nicht empfohlen. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen. Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu zwei Wochen bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei –20 °C oder tiefer möglich.

10. Testdurchführung

10.1. Allgemeines

Vor Testbeginn müssen alle Kitkomponenten für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (18 – 25 °C) gebracht werden.

Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.

Es sollte nur soviel Reagenz entnommen werden, wie für die Durchführung des Tests benötigt wird. Überschüssiges Reagenz darf nicht in die Gefäße zurückgegeben werden, da dies zu einer Kontamination führen kann.

Inkubationslösungen dürfen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden.

Vor Gebrauch die konzentrierten Reagenzien und Patientenseren gut durchmischen, Schaumbildung vermeiden.

Die Kitkomponenten sind während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht zu schützen. Insbesondere die Substratlösung ist lichtempfindlich.

Teststreifen und Reagenzien dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Die Streifen müssen nicht in der Reihenfolge ihrer Nummerierung eingesetzt werden. Es ist aber genau darüber Protokoll zu führen, welcher Streifen mit welcher Probe inkubiert wird.

Die Reproduzierbarkeit von Blot Ergebnissen hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die unten beschriebenen Waschsequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

10.2. Herstellung des gebrauchsfertigen Wasch- / Verdünnungspuffers

Der verdünnte, gebrauchsfertige Wasch- / Verdünnungspuffer wird zum Waschen, für die Probenverdünnung und die Herstellung der Konjugatlösungen benötigt. Das benötigte Volumen an Puffer ist für die Anzahl durchzuführender Tests zu bestimmen (s. Tabelle 2). Der verdünnte Wasch- / Verdünnungspuffer ist geruchlos und leicht getrübt und kann bei einer Lagerung bei 2 – 8 °C vier Wochen verwendet werden. Das Magermilchpulver wird zuerst im Wasch-/Verdünnungspuffer-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (ein Teil Puffer-Konzentrat + neun Teile deionisiertes Wasser).

Tabelle 2: Wasch- / Verdünnungspuffer (Automatenspezifisches Totvolumen nicht berücksichtigt)

Reagenz	Formel	Beispiel für 5 Streifen
Magermilchpulver (g)	= Streifen-Anzahl x 0,1	0,5 g
Wasch-/Verdünnungspuffer-Konzentrat (ml)	= Streifen-Anzahl x 2	10 ml
Deionisiertes Wasser (ml)	= Streifen-Anzahl x 18	90 ml
Gebrauchsfertiger Wasch-/Verdünnungspuffer (ml)	= Streifen-Anzahl x 20	100 ml

Je nach Abarbeitung (manuell bzw. Automat) bitte zusätzliche Wasch-/Verdünnungspuffer für 1-3 Streifen ansetzen.

10.3. Erste Inkubation

Eine der Bestimmungszahl entsprechende Anzahl Vertiefungen der Inkubationswannen wird mit je 2 ml des gebrauchsfertigen Wasch-/ Verdünnungspuffers gefüllt. Pro Bestimmung wird ein Blotstreifen mit einer Pinzette dem Röhrchen entnommen (Streifen dabei nur am Ende mit der Nummerierung anfassen) und in den Puffer eingetaucht. Der Streifen muss vollkommen mit Puffer benetzt sein. Die Streifennummerierung muss nach oben zeigen. Im Anschluss je Streifen 20 µl der unverdünnten Probe (Serum oder Plasma) in die entsprechenden Vertiefungen geben (entspricht einer Verdünnung von 1+100). Es ist darauf zu achten, dass es zu keiner Kontamination benachbarter Vertiefungen und damit zu möglicherweise falsch positiven Resultaten kommt. Während der Inkubation sollten die Wannen mit den beigefügten Deckeln abgedeckt werden.

Die Blotstreifen mit der Probe werden eine Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) inkubiert.

10.4. Waschen

Die Inkubationslösung wird aus den Vertiefungen abgesaugt, vorzugsweise mit einer Absaugpumpe mit angeschlossener Desinfektionsfalle. Jeder Streifen wird dann dreimal 5 Minuten mit je 2 ml gebrauchsfertigem Wasch- / Verdünnungspuffer unter leichtem Schütteln gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wird der Puffer aus den Vertiefungen abgesaugt.

Achtung!

Während des letzten Waschschrattes ist die Konjugatlösung herzustellen.

10.5. Herstellung der Konjugatlösung

Das Konjugat liegt im Kit in konzentrierter Form vor. Die Konzentration ist für das IgA- und IgG-Konjugat gleich. Für die Verwendung im Test wird ein Teil des Konjugat-Konzentrats mit 100 Teilen gebrauchsfertigem Wasch-/Verdünnungspuffer angesetzt (1+100).

Die hierfür benötigten Volumina für die entsprechende Anzahl von Streifen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Da das verdünnte Konjugat nur eine begrenzte Stabilität aufweist, ist es jeweils unmittelbar vor der Verwendung frisch anzusetzen. Eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Tabelle 3: Herstellung der gebrauchsfertigen Konjugatlösungen

Reagenz	Formel	Beispiel für 5 Streifen
Konjugat-Konzentrat (µl)	= Streifen-Anzahl x 20	100 µl
Gebrauchsfertiger Wasch-/Verdünnungspuffer (ml)	= Streifen-Anzahl x 2	10 ml

Die Konjugatmengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. Automat) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1-3 Streifen ansetzen.

10.6. Zweite Inkubation

Zu jedem Streifen werden 2 ml der entsprechenden gebrauchsfertigen Konjugatlösung pipettiert. Danach werden die Streifen 45 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation sollten die Wannen mit den beigegeführten Deckeln abgedeckt werden.

10.7. Waschen

Waschschritt gemäß Pkt. 10.4.

10.8. Dritte Inkubation

Zu jedem Streifen werden 1,5 ml des gebrauchsfertigen Substrats pipettiert. Die Streifen werden 8 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wird das Substrat abgesaugt. Zum Stoppen der Färbereaktion werden die Streifen in den Wannen dreimal mit deionisiertem Wasser abgespült.

Die Streifen werden vorsichtig mit einer Pinzette den Wannen entnommen und zum Trocknen zwischen saugfähiges Papier gelegt (ca. 2 h). Streifen vor Licht geschützt aufbewahren. Nach dem Trocknen können die Streifen ausgewertet werden.

Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Alle Reagenzien werden auf Raumtemperatur gebracht
2. In jede Vertiefung werden 2 ml Verdünnungspuffer pipettiert
3. Pro Vertiefung wird ein Streifen in den Puffer gelegt
4. Zugabe von 20 µl Probe
5. 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur
6. 3maliges Waschen mit 2 ml Waschpuffer; Verweildauer je 5 Min.
7. Zugabe von 2 ml frisch hergestellter Konjugatlösung
8. 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
9. 3maliges Waschen mit 2 ml Waschpuffer; Verweildauer je 5 Min.
10. Zugabe von 1,5 ml Substrat
11. 8 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
12. Spülen der Streifen mit deionisiertem Wasser
13. Trocknen auf Filterpapier (ca. 2 h)
14. Auswertung

11. Auswertung

11.1. Allgemeines

Für eine Auswertung des Tests müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Die Reaktions-Kontrollbande (oberste Linie) sollte deutlich gefärbt sein (dunkle Bande).
- Die IgG- bzw. IgA-Konjugat-Kontrollbande (zweite und dritte Bande) muss eine deutliche Färbung aufweisen.
- Die Cut-off-Kontrolle (vierte Bande) sollte eine schwache aber sichtbare Färbung aufweisen.

Sollten die vorgegebenen Qualitätskriterien nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich gefärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind nach Testwiederholung die Kriterien wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an R-Biopharm.

11.2. Testauswertung und -interpretation

Zur Auswertung der Patientenprobe wird der Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens geklebt. Die Teststreifen mit der Reaktions-Kontrollbande sollten dabei an der eingezeichneten Markierungslinie ausgerichtet werden. Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen, deswegen wird empfohlen, die Teststreifen mit einem durchsichtigen Klebeband links von der Markierungslinie anzukleben.

Anhand des aufgedruckten Kontrollstreifens des Auswertebogens können dann die bei den Patientenproben sichtbaren Banden identifiziert und die Bewertung in die dafür vorgesehenen Felder eingetragen werden. Die Bewertung der Intensität der auftretenden Banden erfolgt anhand der Tabelle 4.

Die Immunglobulin-Klassen (IgA, IgG) sollten gesondert ausgewertet werden.

Tabelle 4: Bewertung der Bandenintensität in Bezug zur Cut-off-Bande

Farbintensität der Banden	Bewertung
Keine Reaktion	-
Sehr schwache Intensität (geringer als Cut-off-Bande)	+/-
Schwache Intensität (entspricht Cut-off-Bande)	+
Starke Intensität (stärker als Cut-off-Bande)	++
Sehr starke Intensität	+++

Den Banden werden, sobald sie über dem Cut-off liegen (d.h. mit mindestens + bewertet wurden), in Abhängigkeit von ihrer Bedeutung Punktwerte gemäß Tabelle 5 zugeordnet. Das Testergebnis wird durch die Addition der Punktwerte bestimmt. Anhand der Gesamtpunktzahl wird die Bewertung der Probe vorgenommen (Tabelle 6).

Tabelle 5: Punktwert der Antigene im RIDA® LINE Helicobacter IgA, IgG

Antigen	Funktion	Punktwert
CagA	Zytotoxin assoziiertes Protein	2
VacA	Vakuolisierendes Zytotoxin	2
GroEL	Chaperon	2
Urease A	kleine Untereinheit der Urease	1
HcpC	Vermutlich β -Lactamase	1
gGT	Gamma Glutamyl Transpeptidase	1

Tabelle 6: Testinterpretation

Summe der Punktzahlen	Beurteilung
0	negativ
1	fraglich
≥ 2	positiv

Ein Serum ist IgG oder IgA-positiv, wenn die Gesamtpunktzahl ≥ 2 ist. Es ist IgG oder IgA-negativ, wenn die Gesamtpunktzahl 0 ist. Seren mit einer Punktzahl von 1 sind als fraglich zu bewerten.

Eine Typ-Differenzierung erfolgt über die CagA- und VacA-Antigenen und ist nur im IgG möglich. Wird die CagA- und/oder VacA-Bande über Cutoff bewertet (d.h. mit mind. +), liegt eine Infektion mit Helicobacter Typ I vor.

12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Ein negatives Ergebnis für Helicobacter pylori kann eine Infektion mit Helicobacter pylori nicht ausschließen. Bei bestehendem klinischem Verdacht auf eine Infektion mit Helicobacter pylori und negativem serologischen Befund sollte nach vier Wochen eine weitere Probenentnahme und Testung erfolgen.

Ein fragliches Ergebnis könnte auf den Beginn einer Immunantwort hindeuten. Es sind Antikörper gegen Helicobacter pylori vorhanden. Eine fortschreitende Serokonversion, die auf ein akutes Krankheitsgeschehen hinweist, ist durch eine wiederholte Austestung nach zwei bis

vier Wochen abzuklären. Ein fragliches Ergebnis kann aber auch nach erfolgter Therapie oder überstandener Infektion beobachtet werden.

Ein positives Ergebnis im RIDA® LINE Helicobacter IgA und/oder IgG bedeutet nicht in jedem Fall, dass ein aktives Krankheitsgeschehen vorliegt. Auch bei einer subklinisch verlaufenden Besiedlung mit *Helicobacter pylori* sind Antikörper nachweisbar. Wegen möglicher pathologischer Veränderungen ist eine Eradikation des Keimes angeraten.

Serologische Testergebnisse sollten immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild gesehen werden. Bei unklaren serologischen Befunden wird der direkte Erregernachweis empfohlen.

Von besonderem diagnostischem Wert sind bei der Interpretation Reaktivitäten von Antikörpern gegen das vakuolisierende Zytotoxin (VacA) und das Zytotoxin-assoziierte Protein (CagA), wobei letzteres stark immunogen ist und bei Vorhandensein von entsprechenden Antikörpern in der Regel als deutliche Bande sichtbar wird. Wegen der geringen Immunogenität von VacA sind Antikörper gegen dieses Zytotoxin selten nachweisbar und erscheinen meist nur als schwache Bande. Der Nachweis von Antikörpern gegen beide Proteine VacA und CagA weist auf eine Infektion mit hoch virulenten *Helicobacter pylori*-Stämmen (Typ I) hin. Bei entsprechendem klinischen Befund sollte, soweit noch nicht erfolgt, eine Gastroskopie zur Abklärung von Ulzera oder eines Karzinoms in Erwägung gezogen werden.

Zur Bedeutung von IgA-Antikörpern bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* liegen zur Zeit nur wenige Untersuchungen vor. Es wird empfohlen diese Untersuchung bei unklaren oder negativen IgG-Befunden vorzunehmen. Ein Nachweis von IgA-Antikörpern deutet auf ein akutes Geschehen hin.

Manche Patientenproben können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z.B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergie). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patientenserum verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z.B. „inverse“ Banden (weiße Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu bewerten. Das entsprechende Serum sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Diagnostische Sensitivität RIDA® LINE Helicobacter

Korrelation zwischen **RIDA® LINE Helicobacter** und Histologie/Kultur positiver Proben

RIDA® LINE Helicobacter	Histologie/Kultur positive Proben (n=120)	
	IgG	IgA
Negativ	4	37
Fraglich	3*	8*
Positiv	113	75
Sensitivität	96,7%	69,2%

* Fragliche wurden als positiv bewertet

13.2. Diagnostische Spezifität RIDA® LINE Helicobacter

Korrelation zwischen **RIDA® LINE Helicobacter** und Histologie/Kultur positiver Proben

RIDA® LINE Helicobacter	Histologie/Kultur negative Proben (n=13)	
	IgG	IgA
Negativ	13	13
Fraglich	0	0
Positiv	0	0
Spezifität	100%	100%

13.3. Prävalenz Blutspender

RIDA® LINE Helicobacter	Blutspender (n=100)	
	IgG	IgA
Negativ	48	79
Fraglich	0	0
Positiv	52	21
Durchseuchung	52%	21%

13.4. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Kapazität des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potenziellen Interferenz-Faktoren in der Proben-Matrix (z.B. Antikoagulantien, Hämolyse, Effekte der Probenbehandlung) oder Kreuzreaktionen mit potentiell interferierenden Antikörpern.

(a) Interferenzen

Kontrollstudien über potentiell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistungen des Tests nicht durch Antikoagulantien (Natriumcitrat, EDTA, Heparin), Hämolyse (bis 1000 mg/dl Hämoglobin), Lipämie, Bilirubinämie (bis 20 mg/dl Bilirubin) oder Tiefgefrier- und Auftauzyklen der Probe beeinflusst werden.

(b) Kreuzreaktionen

In Kontrollstudien wurden die potentiellen Interferenzen von Antikörpern gegen andere Organismen, die ähnliche klinische Symptome wie bei einer Infektion *Helicobacter pylori* hervorrufen können (z.B. *Campylobacter jejuni*), untersucht. Zusätzlich wurden Konditionen, die auf eine atypische Aktivität des Immunsystems zurückzuführen sind (antinukleäre Autoantikörper, Rheumafaktor), getestet. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten nachgewiesen.

Literatur

1. Marshall, B. F., Royce, H., Annear, D. I., Goodwin, C. S., Taylor, N. S., Edmonds, P., Sly, L. I., Brenner, D. J.: Original Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letter* 25, 83 (1982)
2. Warren, J. R.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* I, 1273 - 1275 (1983)
3. Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vanderstetten, D. P., Chang, Y., Vogelmann, J. H., Orentreich, N., Sibley, R. K.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325, 1127 - 1131 (1991)
4. Stolte, M., Eidt, S.: Healing gastric MALT lymphomas by eradicating *H. pylori*. *Lancet* 342, 568 (1993)
5. Stolte, M.: *Helicobacter pylori* and gastric MALT lymphoma. *Lancet* 339, 745 - 746 (1992)
6. Hentschel, E., Brandstatter, G., Dragosics, B., Hirschl, A. M., Nemec, H., Schutze, K., Taufer, M., Wurzer, H.: Effect of Ranitidine and Amoxicillin plus Metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 328, 308 - 312 (1993)
7. Stadelmann, O.: *Helicobacter pylori*: Indikationen und Praxis der Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 92, 39 - 41 (1995)
8. Telford, J. L., Ghiara, P., Dellorco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z. Y., Papini, E., Montecucco, C., Parente, L., Rappuoli, R.: Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* 179, 1653 -1658 (1994)
9. Lee, A.: *H. pylori* initiated ulcerogenesis: look to the host. *Lancet* 341, 281 (1993)
10. Schmitt, W., Haas, R.: Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin - structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 12, 307 - 319 (1994)
11. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., Rappuoli, R.: Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5791 - 5795 (1993)
12. Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R.: 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.* 63, 94 (1995)

13. Krakowka, S., Morgan, D. R., Kraft, W. G., Leunk, R. D.: Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect. Immun.* 55, 2789 - 2796 (1987)
14. Karita, M., Li, Q., Cantero, D., Okita, K.: Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germ-free mice. *Am. J. Gastroenterol.* 89, 208 - 213 (1994)
15. Marchetti, M., Arico, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R., Ghiara, P.: Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267, 1655 - 1658 (1995)
16. Jaskowski, T. D., Martins, T. B., Hill, H. R., Litwin, C. M.: Immunoglobulin A Antibodies to *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2999 - 3000 (1997)
17. Yunoki N, Yokota K, Mizuno M, Kawahara Y, Adachi M, Okada H, Hayashi S, Hirai Y, Oguma K, Tsuji T: Antibody to Heat Shock Protein Can Be Used for Early Serological Monitoring of *Helicobacter pylori* Eradication Treatment. *Clin Diagn Lab Immun*, July 2006, Vol 19, No.3, p449-490.
18. Annibale B, Lahner E, Santucci A, Vaira D, Pasquali A, Severi C, Mini R, Figura N, Fave GD: CagA and VacA are Immunoblot Markers of Past *Helicobacter pylori* in Atrophic Body Gastritis. *J. Compilation* © 2007 Blackwell Publishing Ltd, *Helicobacter* 12:23-30, *Helicobacter* ISSN 1523-5378
19. Gao L, Weck MN, Michel A, Pawlita M, Brenner H: Association between chronic atrophic gastritis and serum antibodies to 15 *Helicobacter pylori* proteins measured by multiplex serology. *Cancer Res* 2009 Apr 1; 69(7): 2973-80

RIDA® LINE Helicobacter IgA, IgG

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. The RIDA® LINE Helicobacter IgA, IgG is a qualitative line immunoassay for the detection of IgA and IgG antibodies against Helicobacter pylori in human serum or plasma.

In contrast to ELISA, the test principle allows the identification of specific antibodies against the various antigens of Helicobacter pylori through the separate line-up of different single antigens. By using type-specific antigens it is also possible to differentiate between an infection with type I and type II.

The RIDA® LINE Helicobacter IgA, IgG is a confirmatory test and can be used to clarify unclear screening results.

2. General

First descriptions of spirally-formed organisms found in the stomach of humans date back to the turn of the century. At the beginning of the 80's, Marshall and Warren were successful in cultivating the organism from a patient with chronically active gastritis, and therewith were able to give a detailed description of the organism. The spirally-formed bacteria are found especially in the mucosa of the antrum. At first, the organism was named Campylobacter pyloridis or pyloris, but after the creation of a separate genus Helicobacter, it was changed to Helicobacter pylori.

Helicobacter pylori is a Gram-negative, spirally-formed bacterium with up to three spirals. Like all members of the genus Helicobacter, Helicobacter pylori also possesses flagella (unipolar, 2 - 6 flagella). A positive identification is ensured by the very strong urease reaction as well as the positive detection of catalase and oxydase in the corresponding culture morphology.

Different Helicobacter pylori isolates show a high genetic variability, but their phenotypic characteristics are mostly similar. The only phenotypic differences known at the moment restrict themselves to the production or the non-production of a vacuolating cytotoxin, VacA, and a cytotoxin associated protein, CagA. Due to this difference, clinical isolates are divided into 2 types. Helicobacter pylori strains of type I have the ability to produce these proteins. All other strains which do not have this ability belong to type II. It is worth noting that patients with duodenal ulcers are more often infected with the VacA and the CagA expressing type I, which could mean that type I infections lead to more serious illnesses. These clinical diagnoses are reinforced with the observation that lysates of Helicobacter pylori type I or purified VacA can lead to stomach damages in mice.

So far, it has not been determined how *Helicobacter pylori* is transmitted. It is assumed that the pathway of transmission is either oral-oral or fecal-oral. *Helicobacter pylori* is associated with nearly all duodenal and stomach ulcers, as well as with MALT-lymphoma of the stomach and is also associated with a higher risk for gastric adenocarcinoma. *Helicobacter pylori* has been classified as a carcinogen of group 1 by the WHO. Nearly 50% of the world population is infected, whereby the prevalence in the developed countries rises only slowly with advancing age, in contrast to the developing countries. Usually, in the developing countries, infection occurs during childhood and persists over decades. Even though all *Helicobacter pylori* infected people histologically develop a gastritis this leads to more serious illnesses such as peptic ulcers, gastric carcinoma or MALT-lymphoma in only approx. 10%. Next to the different virulent strains of type I and II, host factors are also discussed as possible causes.

Fundamentally, the diagnostic strategies can be differentiated between invasive and non-invasive methods. The invasive method involves the histological detection of the organism from biopsy material which is derived from the upper gastrointestinal tract. This is linked with the detection of urease activity of the organism from the biopsy material. Culturing of the organism can follow. The gastroscopy is usually necessary to exclude the presence of a carcinoma or for therapeutic reasons (e.g. to stop hemorrhages). However, a gastroscopy alone cannot detect or exclude an *Helicobacter pylori* infection. The biopsy can lead to false negative results, since material can be removed from places of the stomach where *Helicobacter pylori* has not colonized.

With the identification of serum antibodies the non-invasive diagnosis by enzyme immunoassay or western or line blot gains importance in view of its advantages for the patients. Herewith, the enzyme immunoassay is distinguished by its easy handling as a screening method. Additionally, the line blot has the advantage that it differentiates between type I and II *H. pylori*. Due to the separation of the antigens, antibodies directed against them can be identified isolated and conclusions about the presence of VacA and CagA can be drawn. Herewith, an analysis of the different *Helicobacter pylori* types with their clinical significance is made possible.

The eradication of *Helicobacter pylori* with a combined antibiotic therapy can heal the gastritis and can also lead to an accelerated healing of an ulcer. Only when *Helicobacter pylori* as the cause of the ulcer has been eradicated will the healed ulcera remain in remission.

3. Test principle

For this line immunoassay, highly purified recombinant antigens of *Helicobacter pylori* (CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC, gGT) are fixed on nitrocellulose membrane strips.

These strips will be incubated with the samples (serum, plasma). Specific antibodies present in the samples will bind to the pathogen antigens on the strip. After removing the unbound antibodies by washing, a second incubation with anti-human IgA or IgG conjugate follows. In the last step (staining reaction), specifically bound antibodies against the different *Helicobacter pylori* antigens become visible as dark bands on the strips.

4. Reagents provided

Table 1: Pack contents

(there are enough reagents in a pack for 20 determinations)

			LB2313 IgA	LB2323 IgG
Strip	20	2 x 10 test strips (numbered); coated with H. pylori antigen	X	X
Wash/Diluent 10x	100 ml	Wash / dilution buffer; 10x concentrated phosphate buffer; contains NaCl, KCl and detergent, preservative : MIT (0.1%) and Oxypyron (0.2%)	X	X
MP	5 g	Milk powder; from skim milk	X	X
Conjugate IgA 100x <i>colourless lid</i>	500 µl	Anti-human IgA conjugate (rabbit); 100x concentrated peroxidase conjugated antibodies; contains < 0.1 % NaN ₃ , MIT (<0.1%), chloracetamide (<0.1%)	X	
Conjugate IgG 100x <i>green lid</i>	500 µl	Anti-human IgG conjugate (rabbit); 100x concentrated peroxidase conjugated antibodies; contains < 0.1 % NaN ₃ , MIT (<0.1%), chloracetamide (<0.1%)		X
Substrate	40 ml	Chromogenic substrate; ready for use; contains tetramethylbenzidine	X	X
Evaluation sheet	1		X	X

5. Reagents required but not provided

5.1. Reagents

- Deionized water

5.2. Accessories

- Incubation trays (please order with Art. No. LB0003 if required)
- Vacuum pump to remove liquid out of the incubation chambers
- Horizontal shaker
- Vortex mixer
- Micropipettes for volumes 20 µl and 1000 µl
- 10 ml pipette
- Measuring cylinder, 50 ml and 1000 ml
- plastic tweezers to handle the teststrips

6. Warnings and precautions for the users

For *in vitro* diagnostic use only.

The test has to be used only by trained and authorized laboratory personal. Please refer to guidelines for safety regulations in medical laboratories. The test protocol must be followed strictly.

Do not mouth pipette samples or reagents. Avoid contact with injured skin or mucous membranes. Wear disposable gloves while handling samples and wash hands after assay is complete. Do not smoke, eat or drink in areas where specimen or kit reagents are handled.

After the addition of patient or control specimens the strips, the material which was in contact with it as well as the patient samples itself should be considered potentially infectious and be treated with respect to the given national safety precautions.

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

The conjugates contain sodium azides (NaN₃), MIT (methylisothiazolone), oxypyron, chloracetamide and hydrogen peroxide. Contact with skin or mucous membranes must be avoided. Contact with lead or copper pipes sodium azide can form explosive metal azides.

Cross-contamination of patient samples or conjugates can lead to inaccurate test results.

7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 – 8 °C (**do not freeze**) and can be used up to the expiry date printed on the labels. Substrate, wash/dilution buffer and conjugate from kits with different lot numbers could be used. Please note the shelf-life of these components.

Microbial contamination has to be avoided.

The concentrated conjugates have to be diluted freshly in required amounts. It is not possible to store the ready-for-use conjugate solution.

Ready-for-use wash/dilution buffer is odorless and easily marred. If stored at 2 – 8 °C it can be used up to four weeks.

The tube containing the test strip should be only opened immediately before use to avoid condensation. Leave unused strips in the tube and continue to store at 2 – 8 °C (reseal tube tightly, test strips must not become moist before the test!).

The test kit components must be protected from direct sunlight throughout the entire test procedure. The substrate solution is especially sensitive to light.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

The packages have an expiry date after which a quality warranty cannot be given. Substrate solution must not be used if turned blue.

9. Specimen collection and storage

The RIDA[®] LINE Helicobacter can be carried out with serum or plasma.

The use of heat-inactivated, icteric, haemolysed, lipemic or turbid samples is not recommended. Microbial contamination must be avoided. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended. Insoluble substances must be removed from the sample before incubation. The sample material can be stored for up to 2 weeks at 2 – 8 °C if the test cannot be carried out immediately. A prolonged storage of samples is possible at –20 °C or below.

10. Test procedure

10.1. Preliminary comments

Bring all kit components at room temperature (18 – 25 °C) for at least 30 minutes prior to use. The test procedure is carried out at room temperature.

Remove only the volume of reagents that is needed for test procedure. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.

Make sure that incubation solutions do not flow over into other wells. Mix the concentrated reagents and samples thoroughly before use. Avoid a build up of foam. Protect kit components from direct sunlight throughout the entire test procedure. The substrate is especially sensitive to light.

Microwell strips and reagents must not be used if pouch is damaged or vials are leaking.

The strips do not have to be used in their order of numeration. But it is important to keep a record about which strip is incubated with the corresponding sample.

The reproducibility of Blot results depend very strongly on the consistency and regularity of washing the strips. The washing steps described below should always be adhered to.

10.2. Preparation of the ready to use wash / dilution buffer

The diluted, ready to use wash / dilution buffer is used for washing, sample dilution and preparation of conjugate solutions. The required volume for the corresponding number of tests must be determined (Table 2). Ready-for-use wash/dilution buffer is odorless and easily marred. If stored at 2 – 8 °C it can be used up to four weeks.

The skimmed milk powder is first pre-dissolved in wash/dilution buffer concentrate and deionised water is then added to this mixture to reach the final volume (1 part of concentrated buffer is diluted with 9 parts deionized water).

Table 2: Wash / dilution buffer per applied strip (device-specific dead volume is not considered)

Reagent	Formula	Example for 5 strips
Skimmed milk powder (g)	= number of strips x 0,1	0.5 g
Wash-/dilution buffer -concentrate (ml)	= number of strips x 2	10 ml
Deionised water (ml)	= number of strips x 18	90 ml
Ready-for-use wash-/dilution buffer (ml)	= number of strips x 20	100 ml

10.3. First Incubation

For each determination, use one chamber of the incubation plate and fill it with 2 ml diluted wash / dilution buffer. For each determination, one blot strip is taken out of the vial with a pair of tweezers (touch the strips at the end with the numeration only). Dip the strip into the buffer. The strip must be completely moistened with buffer.

The strip numeration must show upwards.

20 µl of an undiluted sample (serum or plasma) are pipetted onto the test strip for each incubation mixture (dilution 1+100).

It must be taken care that the neighboring chambers are not contaminated since this could lead to false positive results. During the incubation, the incubation plates should be covered up with the lids that are enclosed in the test kit.

The strips with the samples are placed on a horizontal shaker and are incubated for 1 hour at room temperature (18 – 25 °C).

10.4. Washing

Remove the solution (via suction), preferably with an attached disinfecting trap. Wash the strips three times for 5 min with 2 ml each of the diluted wash / dilution buffer. Place the incubation plate on the shaker. Between the washing steps the buffer is sucked out of the chambers.

Attention!

The conjugate solution must be prepared during the last washing step.

10.5. Preparation of the conjugate solution

The conjugate enclosed in the kit is provided as concentrate. The concentration is the same for the IgA as well as for the IgG conjugate. For its application to the test, one part of the conjugate concentrate is diluted with 100 parts of the ready-for-use wash/dilution buffer (1+100).

The required volumes for the corresponding number of strips are listed in table 3. Since the diluted conjugate is stable only for a limited period of time, it must be prepared freshly prior to its application.

Table 3: Preparation of the ready-for-use conjugate solutions

Reagent	Formula	Example for 5 strips
Conjugate concentrate (µl)	= number of strips x 20	100 µl
Ready-for-use wash/dilution buffer (ml)	= number of strips x 2	10 ml

The quantities are calculated without dead volume. Depending on handling (manual or on a device) please mix additional conjugate for 1 to 3 strips.

10.6. Second incubation

Add 2 ml of the corresponding freshly prepared conjugate solution to each strip. Incubate the strips for 45 minutes on a horizontal shaker at room temperature.

During the incubation, the incubation plates should be covered up with the lids that are enclosed in the test kit.

10.7. Washing

Washing sequence: see point 10.4.

10.8. Third incubation

Add 1.5 ml of the ready to use substrate to each strip. Incubate the strips for 8 minutes at room temperature with gentle shaking. Thereafter, the substrate is removed via suction. Still in their chambers, the strips should be rinsed three times with deionized water to stop the color reaction.

The strips are carefully taken out of the chambers with tweezers. To dry the strips, they are placed between filter paper (2 h). Stripes should be protected from sun light. After drying they can be evaluated.

Summary of the test procedure

1. Bring all reagents to room temperature
2. Add 2 ml wash / dilution buffer into each chamber
3. Place one strip into each chamber
4. Add 20 µl sample
5. Incubate for 1 hour at room temperature
6. Wash 3 times with 2 ml wash / dilution buffer; 5 min each time
7. Add 2 ml freshly prepared conjugate solution
8. Incubate for 45 minutes at room temperature
9. Wash 3 times with 2 ml wash / dilution buffer; 5 min each time
10. Add 1.5 ml substrate
11. Incubate for 8 minutes at room temperature
12. Rinse strips with deionized water
13. Dry on filter paper (2h)
14. Analysis

11. Analysis

11.1. Preliminary comments

An analysis of the test can be carried out if the following criteria have been fulfilled:

- Reaction control band (upper line) is clearly stained (dark band)
- IgG and IgA conjugate control bands (second and third band) respectively must show a clear staining
- Cut-off control (fourth band) must show a weak, but visible staining

If these conditions are not fulfilled, please check the following before repeating the test:

- expiration date of the reagents
- calibration of the used instruments
- exact test procedure
- visual examination of kit components for signs of contamination, deterioration or leakage; substrate solution must not be used if turned blue

If the quality conditions are not fulfilled after repeating, please contact your local distributor of R-Biopharm.

11.2. Test evaluation and interpretation

For evaluation, stick the corresponding test strip onto the appropriate fields on the evaluation form using a glue stick. Align the test strip with the reaction control bands along the marked lines. Sticking the entire test strip down flat using glue or tape can lead to changes in color. Therefore it is recommended to use a transparent adhesive to attach the test strip to the left of the marked line.

Identify the bands of the developed test strips using the printed control strip on the evaluation form and enter it into the evaluation form. Using table 4, carry out the evaluation of the intensity of the resulting bands separately for each of the corresponding immunoglobulin classes IgA and IgG.

Table 4: Evaluation of band intensity in relation to the cut-off band

Stain intensity of the bands	Evaluation
No reaction	-
Very low intensity (lower than cutoff-band)	+/-
Low intensity (equivalent to cut-off band)	+
Strong intensity (stronger than cut-off band)	++
Very strong intensity	+++

The test result is determined according to the sum of the scores in table 5 of the individual bands reactive over the cut-off. (i.e. with a minimum grade of +).

The positive, borderline or negative assessment of the sample can then be determined directly with table 6.

Table 5: Point evaluation of the antigens at RIDA® LINE Helicobacter IgA, IgG

Antigen	Function	Point evaluation
CagA	Cytotoxin associated protein	2
VacA	vacuole cytotoxin	2
GroEL	Chaperon	2
Urease A	Small subunit of urease	1
HcpC	supposable β -Lactamase	1
gGT	Gamma glutamyl transpeptidase	1

Table 6: Test interpretation

Sum of points	Assessment
0	negative
1	questionable
≥ 2	positive

A serum is **IgA- or IgG- positive** if the total point number is ≥ 2 . It is **IgA- or IgG-negative** if the total point number is 0. Sera with a point number of 1 are considered to be **questionable**. The type differentiation is carried out using CagA and VacA antigens and is only possible in the IgG. If the CagA and/or VacA bands react above the cut-off (i.e. with at least +) there is an infection of Helicobacter pylori type I.

12. Remarks about the test procedure and interpretation

A negative result for Helicobacter pylori cannot exclude an infection with Helicobacter pylori. If a clinical suspicion of an infection with Helicobacter pylori with a negative serological diagnosis subsists, after 4 weeks another patient sample should be taken and tested.

A questionable result could indicate the beginning of an immune response. Antibodies against Helicobacter pylori are present. A progressing sera conversion which points toward an acute illness should be clarified with a renewed test after 2 - 4 weeks. A questionable result can also be observed after therapy and an overcome infection.

A positive result with the RIDA® LINE Helicobacter IgA and/or IgG does not mean that an active illness is at hand for each case. Antibodies can also be detected with a subclinically developing cultivation of Helicobacter pylori. Due to possible pathological changes, an eradication of the organism is advisable.

Serological test results should always be seen in connection with the clinical picture. The direct organism detection is advised if unclear serological diagnoses are present.

Of very high diagnostic value for the interpretation, is the reactivity of antibodies against the vacuolating cytotoxin (VacA) and the cytotoxin associated protein (CagA), whereby the last mentioned is strongly immunogen and in the presence of the corresponding antibodies usually visible as a clearly pronounced band. Due to the low immunogenicity of VacA antibodies against this cytotoxin are rarely detectable or are only visible as weak bands. Normally the VacA band is only detectable in combination with the CagA band. The detection of antibodies against these proteins (CagA and VacA) indicates an infection with highly virulent Helicobacter pylori strains (type I). If the corresponding clinical diagnosis exists, a gastroscopy should be considered, if it has not been already done so, for the clarification of ulcera or carcinoma.

Little research is available which explains the significance of IgA antibodies with an infection of *Helicobacter pylori*. It is advised to carry out this examination if unclear or negative IgG diagnoses are present. A detection of IgA antibodies indicates an acute infection.

Some patient samples can produce a dark, uniform or patterned staining across the entire nitrocellulose strip (e.g. on sera from patients with milk protein allergies). Various factors in each patient are responsible for this. The evaluation of these strips is usually only partly feasible. Thus, “inverse” bands (white bands on dark background), for example, should be evaluated as negative. The respective serum should always be examined using other serological methods.

13. Clinical results

13.1. Diagnostic sensitivity of RIDA® LINE Helicobacter

Correlation between **RIDA® LINE Helicobacter** and histology/culture positive samples

RIDA® LINE Helicobacter	Histology/Culture positive samples (n=120)	
	IgG	IgA
Negative	4	37
Equivocal	3*	8*
Positive	113	75
Sensitivity	96,7%	69,2%

* equivocal results are considered positive

13.2. Diagnostic specificity of RIDA® LINE Helicobacter

Correlation between **RIDA® LINE Helicobacter** and histology/culture negative samples

RIDA® LINE Helicobacter	Histology/Culture negative samples (n=13)	
	IgG	IgA
Negative	13	13
Equivocal	0	0
Positive	0	0
Specificity	100%	100%

13.3. Prevalence blood donors

RIDA® LINE Helicobacter	Blood donors (n=100)	
	IgG	IgA
Negative	48	79
Equivocal	0	0
Positive	52	21
Prevalence	52%	21%

13.4. Analytical specificity

The analytical specificity is defined as the capacity of the test to determine analytical accuracy in the presence of potential interference factors in the sample matrix (e.g. anticoagulants, haemolysis, effects of sample treatment) or cross-reactions with potentially interfering antibodies.

(a) Interferences

Controlled studies of potentially interfering factors have shown that test performance was not influenced by anticoagulants (sodium citrate, EDTA, heparin), haemolysis (up to 1000 mg/dl haemoglobin), lipemia, bilirubinemia (up to 20 mg/dl bilirubin) or the deep-freezing and thawing cycles of the sample.

(b) Cross-reactions

The potential interference of antibodies against other organisms that have similar clinical symptoms to those caused by an infection with helicobacter pylori (e.g. Campylobacter jejuni) was examined in control studies. Additionally, conditions that are attributed to atypical activity of the immune system (antinuclear autoantibodies, rheumatoid factor) were tested. No cross-reactivities were detected.

Literature

1. Marshall, B. F., Royce, H., Annear, D. I., Goodwin, C. S., Taylor, N. S., Edmonds, P., Sly, L. I., Brenner, D. J.: Original Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letter* 25, 83 (1982)
2. Warren, J. R.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* I, 1273 - 1275 (1983)
3. Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vanderstetten, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., Sibley, R. K.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325, 1127 - 1131 (1991)
4. Stolte, M., Eidt, S.: Healing gastric MALT lymphomas by eradicating *H. pylori*. *Lancet* 342, 568 (1993)
5. Stolte, M.: *Helicobacter pylori* and gastric MALT lymphoma. *Lancet* 339, 745 - 746 (1992)
6. Hentschel, E., Brandstatter, G., Dragosics, B., Hirschl, A. M., Nemec, H., Schutze, K., Taufer, M., Wurzer, H.: Effect of Ranitidine and Amoxicillin plus Metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 328, 308 - 312 (1993)
7. Stadelmann, O.: *Helicobacter pylori*: Indikationen und Praxis der Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 92, 39 - 41 (1995)
8. Telford, J. L., Ghiara, P., Dellorco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z. Y., Papini, E., Montecucco, C., Parente, L., Rappuoli, R.: Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* 179, 1653 - 1658 (1994)
9. Lee, A.: *H. pylori* initiated ulcerogenesis: look to the host. *Lancet* 341, 281 (1993)
10. Schmitt, W., Haas, R.: Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin - structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 12, 307 - 319 (1994)
11. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., Rappuoli, R.: Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5791 - 5795 (1993)
12. Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R.: 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.* 63, 94 (1995)

13. Krakowka, S., Morgan, D. R., Kraft, W. G., Leunk, R. D.: Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect. Immun.* 55, 2789 - 2796 (1987)
14. Karita, M., Li, Q., Cantero, D., Okita, K.: Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germ-free mice. *Am. J. Gastroenterol.* 89, 208 - 213 (1994)
15. Marchetti, M., Arico, B., Burrioni, D., Figura, N., Rappuoli, R., Ghiara, P.: Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267, 1655 - 1658 (1995)
16. Jaskowski, T. D., Martins, T. B., Hill, H. R., Litwin, C. M.: Immunoglobulin A Antibodies to *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2999 - 3000 (1997)
17. Yunoki N, Yokota K, Mizuno M, Kawahara Y, Adachi M, Okada H, Hayashi S, Hirai Y, Oguma K, Tsuji T: Antibody to Heat Shock Protein Can Be Used for Early Serological Monitoring of *Helicobacter pylori* Eradication Treatment. *Clin Diagn Lab Immunol*, July 2006, Vol 19, No.3, p449-490.
18. Annibale B, Lahner E, Santucci A, Vaira D, Pasquali A, Severi C, Mini R, Figura N, Fave GD: CagA and VacA are Immunoblot Markers of Past *Helicobacter pylori* in Atrophic Body Gastritis. *J. Compilation* © 2007 Blackwell Publishing Ltd, *Helicobacter* 12:23-30, *Helicobacter* ISSN 1523-5378
19. Gao L, Weck MN, Michel A, Pawlita M, Brenner H: Association between chronic atrophic gastritis and serum antibodies to 15 *Helicobacter pylori* proteins measured by multiplex serology. *Cancer Res* 2009 Apr 1; 69(7): 2973-80