

SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgA

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG- oder IgA-Antikörpern gegen *Helicobacter pylori*
in humanem Serum oder Plasma

 SP-007-6 G-S6  48	 SP-007-6 G-S12  96	 SP-007-6 G-S24  2x 96
 <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	CE	
 SP-007-6 A-S6  48	 SP-007-6 A-S12  96	 SP-007-6 A-S24  2x 96
 <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	CE	



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Einführung

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein gramnegatives, spiralförmiges, humanpathogenes Bakterium. Es wird geschätzt, dass etwa die Hälfte der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist, wobei die Infektionsrate in Ländern mit vergleichsweise niedrigerem hygienischem Standard bereits im Kindesalter (< 10 Jahre) bei über 70% und in Ländern mit höherem hygienischem Standard bei 25 - 50% liegt. Für die Verbreitung gelten iatrogene, oral-orale und fäkal-orale Übertragungswege als gesichert. Das Vorkommen tierischer Erregerreservoirs konnte bislang nicht eindeutig belegt werden (1).

H. pylori ist durch eine starke Ureaseaktivität und bei einigen Stämmen vom Typ I durch die Produktion der Toxine VacA (vakuolisierendes Cytotoxin) und CagA (Cytotoxin-assoziiertes Antigen) charakterisiert (2, 3). In weiterführenden Studien (4, 5) wurden die Proteine HcpC (zysteinreiches *Helicobacter* Protein C) und GroEL (Chaperon) als zusätzlich relevante Virulenzfaktoren eingestuft, wobei GroEL eine höhere Wertigkeit zugeschrieben wird (5).

Die pathogenetische Bedeutung dieser extrazellulären Produkte liegt in der direkten Epithelschädigung. Darüber hinaus verursacht die Infektion eine chronische Entzündungsreaktion unter verstärkter Bildung von Entzündungsmediatoren wie Interleukin 8 und 1, sowie Tumornekrosefaktor alpha. Den bei *H. pylori* infizierten häufig nachweisbaren Autoantikörpern gegen Parietalzellen wird eine mögliche Rolle bei der Entwicklung der atrophischen Gastritis als Vorstufe des Magenkarzinoms zugeschrieben (1, 6).

Die primär meist asymptomatisch verlaufende Infektion führt bei etwa 10% der Infizierten zur Ausprägung von *H. pylori* assoziierten Gastritiden, die Folgeerkrankungen wie chronisch-aktive Gastritis, Ulcus ventriculi, Ulcus duodeni, Magenkarzinom sowie MALT-Lymphom nach sich ziehen können. Patienten mit Magenmalignomen und Ulcus duodeni sind zu fast 100% mit *H. pylori* infiziert, Patienten mit chronischer Gastritis zu 80% und mit Ulcus ventriculi zu 70%. Beim Magenkarzinom liegt in 60% der Fälle eine Infektion mit *H. pylori* vor (6).

Der Nachweis einer *H. pylori* Infektion kann durch invasive oder nicht invasive Methoden erfolgen. Bei den invasiven Methoden steht die endoskopische Probenentnahme allen Untersuchungen voran. Mit dem entnommenen Biopsiematerial können folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Histologie
- Urease Schnelltest
- Kultur
- Molekularbiologische Testungen (Nachweis von Nukleinsäure des Erregers oder von resistenzassoziierten Mutationen des Erregers)

In der Routinediagnostik haben sich mittlerweile die nicht invasiven Methoden etabliert. Der am häufigsten verwendete Nachweis ist der ¹³C Harnstoff-Atemtest, der sich durch eine einfache Handhabung und eine hohe Genauigkeit auszeichnet. Dieser Test hat zwar den Vorteil einer hohen Spezifität und Sensitivität, ist aber an spezielle Messgeräte und die Einnahme radioaktiv markierter Substanzen durch den Patienten gebunden.

Inzwischen stehen auch immunologische Stuhltests auf der Basis von spezifischen anti-*H. pylori* Antikörpern (mono- oder polyklonale AK) zur Verfügung, die den direkten Nachweis von *H. pylori* Antigenen aus Kotproben ermöglichen und zur therapeutischen Verlaufskontrolle eingesetzt werden können.

Der serologische Antikörpernachweis mittels Enzymimmunoassay (EIA) stellt die dritte nicht invasive Methode dar. Die Serologie ist mit den anderen Nachweismethoden bezüglich Sensitivität und Spezifität vergleichbar. In den Richtlinien zur Handhabung von *H. pylori* Infektionen (7) wurde hervorgehoben, dass der serologische Nachweis die einzige Methode ist, die unter der Einnahme von Protonenpumpenhemmern (PPI) verlässliche Ergebnisse liefert.

Der SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG und der SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgA Test sollen *Helicobacter pylori*-spezifische Antikörper nachweisen und eine Kategorisierung in Typ I oder Typ II ermöglichen.

Prinzipiell haben sowohl die invasiven als auch die nicht invasiven Methoden Schwachstellen im Nachweis von *H. pylori*. Um diese Unzulänglichkeiten zu minimieren wird in der S2k-Leitlinie (8) für eine zuverlässige Diagnostik empfohlen, dass 2 positive Testergebnisse für die Diagnose einer *H. pylori*-Infektion vorliegen sollten.

Literatur:

1. Bruce E. Dunn, Hartley Cohen, and Martin J. Blaser: *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews, Oct 1997 p 720-741.
2. Hocker M. and Hohenberger P.: *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. Lancet 2003; 362:1231-3.
3. Huang JO., Zheng GF., Sumanac K., Irvine EJ., Hunt RH.: Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 2003; 125:1636-44.
4. 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; 69:2973-80.
5. Gao L., Michel A., Weck MN., Arndt V., Pawlita M., Brenner H.: *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer Risk: Evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology. Cancer Res 2009; 69:2973-80.
6. H. Hahn, D. Falke, U. Ullmann (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage 1999
7. Malfertheiner P, et al.: Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht V/ Florence Consensus Report. Gut 2017; 66:6-30.
8. Fischbach W et al.: S2k-Leitlinie “*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit” der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Z Gastroenterol 2016; 54:327- 363.

Anwendungsbereich

Der **SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG / SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgA Test** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von *Helicobacter*-spezifischen IgG- bzw. IgA-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma. Er kann sowohl als Eingangstest als auch nach positivem ELISA-Suchtest als Bestätigungstest eingesetzt werden.

Testprinzip

Der **SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG / SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgA Test** ist ein Festphasen-immunoassay basierend auf der Verwendung rekombinanter *Helicobacter*-Antigene, die in Array-anordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Antikörper gegen *Helicobacter*-Antigene dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG- bzw. IgA-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte der farblosen Substratlösung. Die Farbintensität der Spots korreliert mit der Antikörperkonzentration. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG- bzw. IgA-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern Seramun *SpotSight®* plate oder Seramun *SpotSight®* strip Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software Seramun *SpotSight®* scan quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete Helicobacter Antigene

Bezeichnung	Charakterisierung		Vorkommen*
CagA	120-145 kD	Zytotoxin-assoziiertes Antigen A	Typ I (hoch virulent)
gGT	59-61 kD	γ -Glutamyltranspeptidase	Typ II (virulent)
GroEL	54-62 kD	Chaperon	Typ II (virulent)
UreA	26 kD	Urease (Untereinheit A)	Typ II (virulent)
VacA	87-97 kD	Vakuolisierendes Zytotoxin	Typ I (hoch virulent)
HcpC	28-32 kD	Cysteinereiches Helicobacter Protein C	Typ II (virulent)

*Stammtypisierung nur im IgG-Nachweis möglich

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen
1	WELLS Kavitäten mit Arrays	6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
IgG-Bestimmung: Farbmarkierung grün; IgA-Bestimmung: Farbmarkierung hellgrün				
2	WASHBUF CONC 10X Waschpuffer Seramun® Wash buffer A	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL Probenverdünnungs- puffer Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	4x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG Anti-human IgG- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe
	oder			
	CONJ HRP IgA Anti-human IgA- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig violett gefärbt transparente Flasche violette Kappe	8 ml gebrauchsfertig violett gefärbt Transparente Flasche violette Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig violett gefärbt transparente Flasche violette Kappe
5	SUBSTR TMB Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe
6	COVER Abdeckfolie	2x	2x	4x
7	SWAB Tupfer mit 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3x2	6x2	12x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (10 µl Probe und 1000 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Fusselfreies Filterpapier
- Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung
- Becherglas und Messzylinder
- Stoppuhr
- Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional)
- Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- Seramun SpotSight® plate oder Seramun SpotSight® strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun SpotSight® scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Folienbeutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBUF CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt sein oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

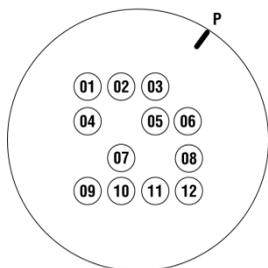
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1 : 101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Probenverdünnungspuffer.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen**. Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgA** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **Lösungen absaugen**. Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschritte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers erfolgen.

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout



Parameter

04	CagA
05	gGT
06	GroEL
07	UreA
08	VacA
09	HcpC

Kontrollen

01	Positivkontrolle (PC)
02	Cut-off Kontrolle (CO)
03	Negativkontrolle (NC)
10	IgG Konjugatkontrolle (GC)
11	IgA Konjugatkontrolle (AC)
12	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO). Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameter-spezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC). Sehr schwach gefärbter Spot, die Farbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Funktionskontrolle (IgG, IgA Konjugatkontrolle, GC, AC). Intensiv gefärbte Spots mit unterschiedlicher Position beim IgG- bzw. IgA-Nachweis. Dient zur Kontrolle des Antikörperisotyps.
5. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befinden hat. Ein Ausbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf das Fehlen von Probe hin.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine der unter Punkt 1. bis 5. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*[®] Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Die Ergebnisse werden wie folgt interpretiert:

Bewertung	IgG	IgA
negativ	kein Antigenspot \geq Cut-off Kontrolle	kein Antigenspot \geq Cut-off Kontrolle
grenzwertig	UreA- oder HcpC- oder gGT-Spot \geq Cut-off Kontrolle	UreA- oder HcpC- oder gGT-Spot \geq Cut-off Kontrolle
positiv	CagA- oder VacA- oder GroEL-Spot oder zwei oder mehrere Antigen-Spots \geq Cut-off Kontrolle	CagA- oder VacA- oder GroEL-Spot oder zwei oder mehrere Antigen-Spots \geq Cut-off Kontrolle

Grenzen der Methode

Eine Interpretation der Ergebnisse muss in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontamination der Reagenzien oder Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide und 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) und Rheumafaktoren (500 IU/ml) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Testdurchführung

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Serologisch vorcharakterisierte Proben (Referenztest 1) im *SeraSpot*[®] Anti-*Helicobacter-6* IgG / *SeraSpot*[®] Anti-*Helicobacter-6* IgA Test untersucht („Initiale Sensitivität“ / „Initiale Spezifität“). Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum *Helicobacter pylori*-Antikörper-Nachweis nachgetestet, wobei die im Referenztest 2 erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der im *SeraSpot*[®]-Test zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienten („Berichtigte Sensitivität“ / „Berichtigte Spezifität“).

IgG	n = 120	Referenztest 1		
		positiv (n = 65)	grenzwertig (n = 7)	negativ (n = 48)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti- <i>Helicobacter-6</i> IgG	positiv	65	2	1
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	0	5	47

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **93,1 %**

Berichtigte Sensitivität: **100,0 %**

Initiale Spezifität: **97,9 %**

Berichtigte Spezifität: **100,0 %**

IgA	n = 118	Referenztest 1		
		positiv (n = 30)	grenzwertig (n = 5)	negativ (n = 83)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti- <i>Helicobacter-6</i> IgA	positiv	28	2	14
	grenzwertig	0	2	4
	negativ	2	1	65

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **91,4 %**

Berichtigte Sensitivität: **95,9 %**

Initiale Spezifität: **78,3 %**

Berichtigte Spezifität: **94,2 %**

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA Test untersucht und das Verhältnis von Farbtintensitäten der Antigenspots zur Cut-off Kontrolle (Ratio) gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten wurden die Variationskoeffizienten (VK) ermittelt.

IgG-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	Ratio [\bar{X}] n = 40	VK [%]	Ratio [\bar{X}] n = 80	VK [%]	Ratio [\bar{X}] n = 240	VK [%]
CagA	3,67	8,09	3,90	7,91	4,03	10,80
gGT	4,04	8,19	2,70	11,07	2,75	12,60
GroEL	3,43	8,04	3,13	11,83	3,25	11,13
UreA	1,45	7,67	1,15	10,05	1,18	11,70
VacA	1,89	7,41	1,55	10,54	1,54	9,71
HcpC	3,91	5,12	3,09	7,28	3,19	10,74
Durchführung	1 Bearbeiter, 40x Bestimmung, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2 Labore 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2 Labore 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 3 Chargen	

IgA-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	Ratio [\bar{X}] n = 40	VK [%]	Ratio [\bar{X}] n = 80	VK [%]	Ratio [\bar{X}] n = 240	VK [%]
CagA	2,92	8,91	2,52	8,86	2,61	11,68
gGT	1,00	9,34	1,28	14,98	1,31	14,42
GroEL	2,88	9,78	2,54	9,22	2,66	13,96
UreA	1,86	9,59	2,31	10,49	2,34	14,11
VacA	3,60	8,48	3,29	13,74	3,40	16,70
HcpC	1,54	8,55	1,63	6,84	1,67	9,76
Durchführung	1 Bearbeiter, 40x Bestimmung, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2 Labore 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2 Labore 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 3 Chargen	

Automatisierbarkeit

Proben (n = 96) mit bekannter Antikörperreaktivität wurden manuell sowie mit dem Mikrotiterplatten-Prozessor DS2[®] (Dy nex Technologies; manuelle Probenvorverdünnung) abgearbeitet. Aus dem Verhältnis der Farbtintensitäten der Antigenspots zur Cut-off Kontrolle (Ratio) wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

Ig-Isotyp-Nachweis	Dy nex DS2 [®] vs. manuelle Abarbeitung	
	r^2 IgG	r^2 IgA
CagA	0,958	0,956
gGT	0,930	
GroEL	0,924	0,954
UreA	0,965	0,929
VacA	0,967	0,961
HcpC	0,941	0,958

r^2 wurde nicht ermittelt, wenn mehr als 90 % der Gesamtzahl (n = 96) der untersuchten Proben keine Antikörperreaktivität für die jeweiligen Antigene zeigten.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *In-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2019-06-XX	Allgemein Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien	Generelle Überarbeitung Lagerung gebrauchsfertiger Waschpuffer

Inkubationsschema SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG / IgA

1.  100 µl Verdünnte Probe (1 : 101)
30 min Inkubation (Raumtemperatur)

 3 x Waschen mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
2.  50 µl Konjugat **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgA**
30 min Inkubation (Raumtemperatur)

 3 x Waschen mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
3.  50 µl Substratlösung **SUBSTR TMB**
30 min Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur)

 Absaugen
4. Bildaufnahme der Kavitäten und Imageanalyse Scanner Seramun *SpotSight*® plate / Seramun *SpotSight*® strip und Software Seramun *SpotSight*® scan

 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	LOT Charge	REF Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® sind eingetragene Marken der Seramun Diagnostica GmbH.

SeraSpot[®] Anti-Helicobacter-6 IgG

SeraSpot[®] Anti-Helicobacter-6 IgA

Spotimmunoassay for detection of IgG or IgA antibodies to *Helicobacter pylori*
in human serum or plasma

 SP-007-6 G-S6  48	 SP-007-6 G-S12  96	 SP-007-6 G-S24  2x 96
 <i>In-vitro</i> -diagnostic device		
 SP-007-6 A-S6  48	 SP-007-6 A-S12  96	 SP-007-6 A-S24  2x 96
 <i>In-vitro</i> -diagnostic device		



Seramun Diagnostica GmbH · Sprehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram-negative, spiral shaped, human pathogenic bacterium which has been found in the stomachs of humans in all parts of the world. In developing countries, 70 to 90% of the population carries *H. pylori* mostly already acquired before the age of 10 years. In developed countries the prevalence of infection ranges from 25 to 50%. *H. pylori* infections are transmitted via the oral-oral, the faecal-oral route or iatrogenic. An animal reservoir for *H. pylori* aside from the human stomach has not been confirmed so far (1).

H. pylori is characterized by a strong urease activity and some strains (type I) additionally produce toxins like VacA (vacuolating toxin) and CagA (cytotoxin-associated antigen A) (2, 3). Further studies have identified HcpC (Helicobacter cysteine-rich protein C) and GroEL (Chaperonin) as new independent virulence factors (4, 5), whereas GroEL is more important than HcpC.

These extracellular products contribute to the pathogenesis by direct damage of the gastric epithelium accompanied by a chronic inflammation with enhanced levels of inflammation mediators like interleukin 8, interleukin 1 or tumor necrosis factor alpha. Patients infected with *H. pylori* often develop autoantibodies to parietal cells. The key-role of these autoantibodies in the development of atrophic gastritis as precursor of gastric cancer has been reviewed (1, 6).

About 10% of the infected persons develop *H. pylori* associated gastritis and secondary diseases like chronic active gastritis, Ulcus ventriculi, Ulcus duodeni, gastric cancer and MALT lymphoma. Patients suffering from gastric malignomas and Ulcus duodeni are infected with *H. pylori* in nearly 100% of the cases. About 80% of patients with chronic gastritis, 70% of patients with Ulcus ventriculi and 60% of patients with gastric cancer are infected with *H. pylori* (6).

Diagnosis is usually based on gastroendoscopy combined with the detection of the pathogen in biopsy material by culture, histology, molecular assays or rapid urease test. Culture from biopsy material is difficult and not always successful. The ¹³C breath test which is often performed as follow up test, detects CO₂ released by the bacterial urease from radioactive labeled urea in patient's breath. This

method is not invasive but the need for special equipment and the uptake of radioactive urea by the patients are disadvantageous.

Immunological tests on the basis of specific anti-*H. pylori* antibodies (mono- or polyclonal) are available. They enable the direct detection of *H. pylori* antigens from faecal specimens and may be used for therapeutic surveillance.

Serology is the third method commonly used as a non-invasive method to diagnose *H. pylori* infection and is concerning sensitivity and specificity comparable to other methods. Furthermore, serology is the only test that is not affected by proton pump inhibitor treatment that could lead to false-negative results in other tests.

Invasive as well as non-invasive tests for detection of *H. pylori* infections contain methodological shortcomings. Therefore, the S2k-guideline (8) recommend to include at least two positive test results to ensure a safe diagnosis of an infection with *H. pylori*.

References:

1. Bruce E. Dunn, Hartley Cohen, and Martin J. Blaser: *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews, Oct 1997 p 720-741.
2. Hocker M. and Hohenberger P.: *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. Lancet 2003; 362:1231-3.
3. Huang JO., Zheng GF., Sumanac K., Irvine EJ., Hunt RH.: Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 2003; 125:1636-44.
4. 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; 69:2973-80.
5. Gao L., Michel A., Weck MN., Arndt V., Pawlita M., Brenner H.: *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer Risk: Evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology. Cancer Res 2009; 69:2973-80.
6. H. Hahn, D. Falke, U. Ullmann (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage 1999.
7. Malfertheiner P, et al.: Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht V/ Florence Consensus Report. Gut 2017; 66:6-30.
8. Fischbach W et al.: S2k-Leitlinie “*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit” der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Z Gastroenterol 2016; 54:327- 363.

Intended use

The **SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG / SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgA test** is an *in vitro* diagnostic device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of *Helicobacter*-specific IgG or IgA antibodies in human serum or plasma. It can be used as screening assay as well as confirmatory assay after a positive ELISA result.

Principle of the test

The **SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG / SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgA test** is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant *Helicobacter* proteins as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96-well microtiter plates. The recombinant antigens serve as capture molecules for antibodies against *Helicobacter* antigens. Bound antibodies are detected by horseradish peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG- or IgA-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots are developed by precipitated product from colorless substrate solution. Color intensity is correlated to the antibody concentration. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 2

Incubation of wells with the HRP-labeled anti-human IgG- or IgA for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution SeramunBlau® spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light.

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner; the obtained images are interpreted by using the Software Seramun *SpotSight*® scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Used Helicobacter antigens

Nomenclature	Characterization	Incidence*	
CagA	120-145 kD	cytotoxin-associated antigen A	type I (high virulent)
gGT	59-61 kD	γ-glutamyl transpeptidase	type II (virulent)
GroEL	54-62 kD	chaperone	type II (virulent)
UreA	26 kD	urease (subunit A)	type II (virulent)
VacA	87-97 kD	vacuolating cytotoxin	type I (high virulent)
HcpC	28-32 kD	Helicobacter cysteine-rich protein C	type II (virulent)

*strain typing only in IgG-detection possible

Kit components

		For 48 determinations	For 96 determinations	For 2x 96 determinations	
1	WELLS	Wells with arrays	6 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	2x 12- single breakable 8-well strips in frame separately vacuum-sealed with desiccant
IgG detection: color coding green; IgA detection: color coding light green					
2	WASHBUF CONC 10X	Wash buffer Seramun® Wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap
	CONJ HRP IgA	Anti-human IgA-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored purple, transparent bottle, purple cap	8 ml ready-to-use solution, colored purple, transparent bottle, purple cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored purple, transparent bottle, purple cap
5	SUBSTR TMB	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap
6	COVER	Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB	Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x2	6x2	12x2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (e.g. 10 µl sample and 1000 µl sample diluent) with the ready-to-use sample diluent.

Materials required but not provided

- Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Reagent container for multi-channel micro-pipettes
- Distilled or deionized water
- lint-free absorbent paper
- Test tubes (1 ml) for sample dilution
- Beaker and measuring cylinder
- stop watch
- Washer for 96-well microtiter plates (optional)
- Collecting devices for infectious material
- Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*® scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtiter plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or de-ionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water. The substrate **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Performance at room temperature (18...25 °C) and at the specified incubation times.

For the handling of *SeraSpot*[®] tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipet tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells using the swab **SWAB** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

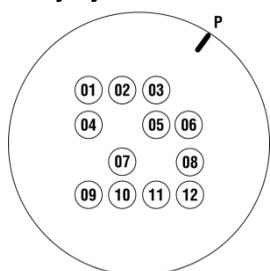
1. Warm all reagents to room temperature before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1 : 101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample dilution buffer.
3. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgA** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (aspirate and discard conjugate), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **SUBSTR TMB** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (aspirate and discard substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
11. Clean bottom of wells with Swab **SWAB**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*[®] plate or the Seramun *SpotSight*[®] strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*[®] scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*[®] strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

Aspiration and washing steps can be performed manually or via washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when the plate is stored in the dark.

Test evaluation

Array layout



Parameter	Controls
04 CagA	01 Positive control (PC)
05 gGT	02 Cut-off control (CO)
06 GroEL	03 Negative control (NC)
07 UreA	10 IgG conjugate control (GC)
08 VacA	11 IgA conjugate control (AC)
09 HcpC	12 Serum control (SC)
	P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA test includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO). Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC). Pale spot with intensity lower than Cut-off control
4. IgG, IgA conjugate control (GC, AC). Intensively stained spots with different position for IgG and IgA antibody detection. Serving as antibody isotype control.
5. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 5 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun *SpotSight*[®] scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed according to the following classification:

Result Interpretation	IgG	IgA
negative	no antigen spot \geq Cut-off control	no antigen spot \geq Cut-off control
borderline	UreA- or HcpC- or gGT spot \geq Cut-off control	UreA- or HcpC- or gGT spot \geq Cut-off control
positive	CagA- or VacA- or GroEL spot or two or more antigen spots \geq Cut-off control	CagA- or VacA- or GroEL spot or two or more antigen spots \geq Cut-off control

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) and rheumatoid factors (500 IU/ml) do not interfere with the test.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity and specificity

Serologically pre-determined samples (reference test 1) were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgA test ("Initial sensitivity" / "Initial specificity"). Samples with discrepant results were retested in a second assay for detection of *Helicobacter pylori* antibodies. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results ("Amended sensitivity" / "Amended specificity").

IgG		Reference test 1		
		positive (n = 65)	borderline (n = 7)	negative (n = 48)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Helicobacter-6 IgG	positive	65	2	1
	borderline	0	0	0
	negative	0	5	47

Borderline samples were valued positive.

Initial sensitivity: **93.1** %

Amended sensitivity: **100.0** %

Initial specificity: **97.9** %

Amended specificity: **100.0** %

IgA		Reference test 1		
		positive (n = 30)	borderline (n = 5)	negative (n = 85)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Helicobacter-6 IgA	positive	28	2	14
	borderline	0	2	4
	negative	2	1	65

Borderline samples were valued positive.

Initial sensitivity: **91.4** %

Amended sensitivity: **95.9** %

Initial specificity: **78.3** %

Amended specificity: **94.2** %

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgG / SeraSpot® Anti-Helicobacter-6 IgA test. Color intensity of antigen spots divided by the color intensity of the Cut-off spot (Ratio) was recorded and the coefficients of variation (CV) were calculated.

IgG detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	Ratio [\bar{x}] n = 40	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	CV [%]
CagA	3.67	8.09	3.90	7.91	4.03	10.80
gGT	4.04	8.19	2.70	11.07	2.75	12.60
GroEL	3.43	8.04	3.13	11.83	3.25	11.13
UreA	1.45	7.67	1.15	10.05	1.18	11.70
VacA	1.89	7.41	1.55	10.54	1.54	9.71
HcpC	3.91	5.12	3.09	7.28	3.19	10.74
Procedure	1 operator, 40x determination, 1 batch		5 operator, 2 laboratories 2x determination, 2x testing per day, 20 days,1 batch		5 operator, 2 laboratories 2x determination, 2x testing per day, 20 days, 3 batches	

IgA detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	Ratio [\bar{x}] n = 40	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	CV [%]
CagA	2.92	8.91	2.52	8.86	2.61	11.68
gGT	1.00	9.34	1.28	14.98	1.31	14.42
GroEL	2.88	9.78	2.54	9.22	2.66	13.96
UreA	1.86	9.59	2.31	10.49	2.34	14.11
VacA	3.60	8.48	3.29	13.74	3.40	16.70
HcpC	1.54	8.55	1.63	6.84	1.67	9.76
Procedure	1 operator, 8x determination, 1 batch		1 operator, 2 laboratories 8x determination, 2x testing per day, 3 days,1 batch		1 operator, 2 laboratories 8x determination, 2x testing per day, 3 days, 3 batches	

Automation

Samples (n = 96) of known antibody titer (IgG and IgA) were assayed manually or by use of the microplate processor DS2® (Dy nex Technologies; manual sample dilution). Color intensity of antigen spots divided by the color intensity of the Cut-off spot (Ratio) was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r^2 for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

Ig isotype detection	Dy nex DS2® vs. manual processing	
	r^2 IgG	r^2 IgA
CagA	0.958	0.956
gGT	0.930	
GroEL	0.924	0.954
UreA	0.965	0.929
VacA	0.967	0.961
HcpC	0.941	0.958

r^2 was not determined if more than 90 % of the total number (n = 96) of the samples showed no antibody reactivity for the particular antigens.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, washing buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. The reagents must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8 °C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

In particular the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2019-06-XX	General	General revision
	Preparation and storage of reagents	Storage of ready-to-use wash solution

Incubation scheme *SeraSpot*[®] Anti-Helicobacter-6 IgG / IgA

- | | | | |
|----|--|-------------------------------|---|
| 1. | 
 | 100 µl
30 min
3 x wash | diluted sample (1 : 101)
incubation (room temperature)
with wash solution, each 400 µl per well |
| 2. | 
 | 50 µl
30 min
3 x wash | conjugate CONJ HRP IgG or CONJ HRP IgA
incubation (room temperature)
with wash solution, each 400 µl per well |
| 3. | 
 | 50 µl
30 min
aspiration | substrate SUBSTR TMB
incubation (room temperature, protected from light) |
| 4. | imaging of wells and image analysis | | scanner Seramun <i>SpotSight</i> [®] plate / Seramun <i>SpotSight</i> [®] strip and software Seramun <i>SpotSight</i> [®] scan |

 Manufacturer	 Date of manufacture	 Use by	 LOT Batch code	 REF Catalog number
 Keep away from sunlight	 Temperature limits	 Biological risks	 Do not reuse	
 Consult instructions for use	 Caution	 IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device	 Contains sufficient for <n> tests	

SeramunBlau[®], *SeraSpot*[®] und Seramun *SpotSight*[®] are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.