

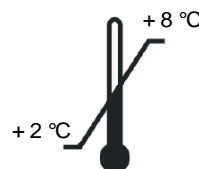
Helicobacter pylori Antigen ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des Helicobacter pylori in Stuhl
For the in vitro Determination of Helicobacter pylori in stool

Gültig ab / Valid from 04.06.2008



K 6920



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.Immundiagnostik.com

	Seite/Page
Inhaltsverzeichnis	1
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. PROBENVORBEREITUNG	6
8. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
PIPETTIERSHEMA	6
9. ERGEBNISSE	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
12. VORSICHTSMAßNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

1. INTENDED USE	13
2. INTRODUCTION	13
3. PRINCIPLE OF THE TEST	13
4. MATERIAL SUPPLIED	14
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
7. SAMPLE PREPARATION	16
8. ASSAY PROCEDURE	16
PROCEDURAL NOTES	16
TEST PROCEDURE	17
9. RESULTS	18
10. QUALITY CONTROL	18
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
12. PRECAUTIONS	19
13. TECHNICAL HINTS	20
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	20

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Helicobacter pylori** in Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Helicobacter pylori (Hp) wird als Kausalfaktor der chronischen B-Gastritis, des nicht medikamentös bedingten Ulcus duodeni, als ätiologischer Stimulus des gastralen MALT-Lymphoms und als ein an der Magenkarzinom-Entwicklung beteiligter Erreger angesehen.

Die Epidemiologie der Helicobacter pylori Infektion ist in westlichen Industrienationen durch eine lineare Zunahme mit dem Alter und in Entwicklungsländern durch eine breite Durchseuchung bereits bei Kindern und Jugendlichen charakterisiert.

Die derzeit etablierten Testverfahren zur Diagnostik von Helicobacter pylori sind sensitiv und hoch spezifisch, benötigen jedoch invasive Maßnahmen oder spezielle technische Voraussetzungen.

Wir haben einen ELISA zur Bestimmung des Helicobacter pylori aus Stuhl entwickelt. Der Test bietet den Vorteil, ohne Verlust der Sensitivität oder Spezifität und ohne einen invasiven Eingriff, eine sichere Diagnostik zu gewährleisten, die zudem noch kostengünstig ist.

Indikation:

- Nachweis einer Helicobacter pylori Infektion
- Kontrolle der Therapie einer Helicobacter pylori Infektion

3. TESTPRINZIP

Gegen Helicobacter pylori gerichtete polyklonale Antikörper sind auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Die in der Probe vorhandenen Helicobacter pylori Erreger binden im ersten Inkubationsschritt an diese Antikörper. Nach einem Waschschrift wird das gebundene Antigen, Helicobacter pylori, mit einem biotinylierten Antikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase/TMB-Systems detektiert. Durch die Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur Analytmenge (Probe bzw. Kontrolle) proportional. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich des ermittelten Wertes mit dem cut-off-Wert.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6920MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6920WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6920PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer; 2,5x	1 x 90 ml
K 6920VP	2.ABDIL	Verdünnungspuffer für 2. Antikörper, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6920KO1	CTRL NEG	Kontrolle negativ, lyophilisiert	4 vials
K 6920KO2	CTRL POS	Kontrolle positiv, lyophilisiert	4 vials
K 6920A2	2.AB	2. Antikörper (anti-Helicobacter pylori, biotinyliert)	1 x 200 µl
K 6920K	CONJ	Konjugat, Streptavidin Peroxidase-markiert	1 x 200 µl
K 6920TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6920AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter bei 450 oder 405 nm (Referenzwellenlänge bei 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie beim Mehrfachansatz der Platte darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden** (z. B. POD-Streptavidin ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen (innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in Aqua bidest. verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Aqua bidest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) muss vor Gebrauch **1:2.5** mit aqua bidest. verdünnt werden (90 ml SAMPLEBUF + 135 ml aqua bidest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur/ Wasserbad 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 3 Monate** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- Der **2.AB** (2. Antikörper) wird **1:100** in **2.ABDIL** (Antikörperverdünnungspuffer) verdünnt (100 µl biotinylierter **2.AB** + 9.9 ml **2.ABDIL**). Unverdünnter Antikörper ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter Antikörper kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat) (Streptavidin, Peroxidase-markiert) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 9.9 ml Waschpuffer). Unverdünntes CONJ ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat kann nicht aufbewahrt werden.**
- Die lyophilisierten **Kontrollen, negativ bzw. positiv** (CTRL NEG bzw. CTRL POS), werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 min stehen gelassen. Die lyophilisierten Kontrollen sind bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Rekonstituierte Kontrollen können nicht aufbewahrt werden.**

7. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlproben

Der Test kann mit frischem oder gefrorenem gelagertem Stuhl angesetzt werden. Wenn der Stuhl nicht am selben Tag getestet wird, sollte dieser bis zu seiner Verwendung bei -20 °C oder kälter gelagert werden.

100 mg Stuhl frisch einwiegen und in **1 ml** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) lösen (vortexen). Danach wird die Stuhlsuspension für 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics / Mannheim AG (Best. Nr. 745804).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien einer Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

Wir empfehlen Doppelbestimmungen durchzuführen und bei allen Inkubationsschritten die Mikrotiterplatte mit Abdeckfolie zu versehen. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen und gut mischen. Direktes Sonnenlicht während der Inkubationsschritte vermeiden. Die Platte vor Gebrauch **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

1. **100 µl CTRL POS/CTRL NEG/SAMPLEBUF/SAMPLE** (Positiv- bzw. Negativkontrolle, Probenverdünnungspuffer (Leerwert) und Stuhlsuspensionüberstände) in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur abgedeckt und unter Schütteln inkubieren. Alternativ kann der Assay **über Nacht** bei 2-8 °C ohne Schütteln inkubiert werden.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **7 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl** verdünnten **2.AB** (2. Antikörper, biotinyliert) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur abgedeckt und unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **7 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl** verdünntes **CONJ** (Konjugat, POD-Streptavidin) pro Vertiefung pipettieren.
8. **1 Stunde** bei Raumtemperatur abgedeckt und unter Schütteln inkubieren.
9. Den Inhalt der Platte verwerfen und **7 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
10. **100 µl SUB** (TMB-Substratlösung) pro Vertiefung pipettieren.
11. **5 - 15 Minuten** (entsprechend der Farbentwicklung) bei Raumtemperatur inkubieren.
12. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
13. Absorption sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Absorption der Positivkontrolle den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

9. ERGEBNISSE

Berechnung der Werte

Absorption des Leerwerts muss < 0.150 sein. Ist der Wert höher, muss der Testlauf wiederholt werden.

Testergebnis

Cut off-Wert = 0.150 bei 450/620 nm bzw. 0.190 bei 450 nm

Als **positiv** werden Proben betrachtet, deren Absorptionswert mindestens 0.020 (Messung bei 450/620 nm) bzw. 0.025 (Messung bei 450 nm) über dem Cut-off-Wert liegen.

Als **grenzwertig** werden solche Proben betrachtet, deren Absorptionswert 0.020 (0.025) unterhalb oder oberhalb des Cut-off-Wertes liegen. Diese Bestimmungen sind zu wiederholen.

Wird bei einer Wiederholungsmessung wieder ein Grenzwert im **unteren** Bereich gemessen, sollte mit einer neuen Probe die Bestimmung wiederholt werden.

Wird bei der Wiederholungsmessung wieder ein Grenzwert im **oberen** Bereich gemessen, ist das Ergebnis als **positiv** zu werten.

Als **negativ** werden solche Proben beurteilt, deren Absorptionswert mehr als 0.020 bzw. mehr als 0.025 **unterhalb** des Cut-off-Wertes liegen.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Absorptionswert der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0.190 und bei 450/620 nm kleiner 0.150 ist bzw. der Wert der Positivkontrolle bei 450 nm größer 0.54 und bei 450/620 nm größer 0.50 ist. Werden die erwarteten Sollwerte nicht erreicht, ist der Test zu wiederholen.

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität und Spezifität

Sensitivität, Spezifität, positiv- (PPW) und negativ-prädikative Werte (NPW) erhalten mit dem Test

	%
Klinische Sensitivität	97,7
Klinische Spezifität	96,3
Positiver prädikativer Wert	98,8
Negativer prädikativer Wert	92,9

Proben, n = 113; H. pylori positiv, n = 86; H. pylori negativ n = 27

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Die Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Helicobacter pylori Antigen ELISA Kit

For the in vitro Determination of Helicobacter pylori in stool

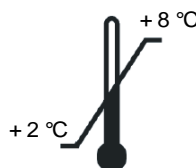
Valid from 04.06.2008



K 6920



96



1. INTENDED USE

This *Immundiagnostik* Assay is a sandwich ELISA for determination of *Helicobacter pylori* in stool. The test kit is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Helicobacter pylori is regarded as a causative factor for chronic B-gastritis, drug-unrelated ulcer duodeni, and as an etiologic stimulus of gastric MALT-lymphoma. Furthermore, it is suspected of being involved in the pathogenesis of stomach carcinoma.

The epidemiology of infection by *Helicobacter pylori* has been characterized in western industrial nations by a linear increase with age increasing and in developing countries by a large number of children and juveniles being affected.

The currently used methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection are very sensitive and highly specific, but all include either invasive sampling or require special technical devices.

We have developed an ELISA for the detection of *Helicobacter pylori* infection from faecal samples. This cost-efficient methodology provides a reliable result without the loss of sensitivity or specificity and does not require invasive sampling.

Indications:

- Detection of a *Helicobacter pylori* infection
- Monitoring the effect of a *Helicobacter pylori* treatment

3. PRINCIPLE OF THE TEST

A microtiter plate is coated with polyclonal antibodies specific for *Helicobacter pylori* which bind *Helicobacter pylori* from the patient sample in a first incubation step. After a washing step, the bound antigen, *Helicobacter pylori*, is incubated with a biotin-labeled antibody. After a further washing step, a peroxidase-labeled streptavidin is added. Then a chromogenic substrate (TMB) is added, followed by a stop solution. The color changes from blue to yellow. The intensity of the color is proportional to the amount of analyte (sample or control). The results are evaluated by comparison with a cut-off value.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No.	Content	Kit Components	Quantity
K 6920MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6920WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6920PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer; 2.5x	1 x 90 ml
K 6920VP	2.ABDIL	2. nd Antibody dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 6920KO1	CTRL NEG	Control negative, lyophilized	4 vials
K 6920KO2	CTRL POS	Control positive, lyophilized	4 vials
K 6920A2	2.AB	2. nd Antibody (anti-Helicobacter pylori biotin-labeled)	1 x 200 μ l
K 6920K	CONJ	Conjugate, peroxidase-labeled streptavidin	1 x 200 μ l
K 6920TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6920AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The ELISA **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) should be diluted with aqua bidest. **1:2.5** before use (90 ml SAMPLEBUF + 135 ml aqua bidest), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for three months.**
- The **2.AB** (2. antibody) must be diluted **1:100** in **2.ABDIL** (2.nd antibody dilution buffer) (100 µl biotin-labelled **2.AB** + 9.9 ml **2.ABDIL**). The undiluted antibody is stable at 2 -4 °C up to the expiry date stated on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate, POD-labelled streptavidine) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 µl **CONJ** + 9.9 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at 2-4 °C up to the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate solution is not stable and can not be stored.**
- The **CTRL NEG/CTRL POS** (controls, both negative and positive), must be reconstituted with **500 µl** bidest. water. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted controls are not stable and can not be stored.**

7. SAMPLE PREPARATION

Faeces

The test can be performed on either fresh or frozen stool samples. If the test cannot be performed within one day, the specimen should be stored at -20°C or colder.

Add a stool sample of **100 mg** to **1 ml** of the sample dilution buffer (SAMPLEBUF) and homogenize thoroughly on a Vortex-mixer. Centrifuge the suspension for 15 min at 3000 rpm.

Immundiagnostik recommends for sample preparation the use of Roche Diagnostics / Mannheim sample preparation tubes, article No. 745804.

8. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Carry out the tests in duplicate. Cover the microtiter plate during the different incubation steps. Bring all reagents samples to room temperature before use and mix well. Avoid direct sun light during all incubation steps. Wash the precoated microtiter strips **5 x with 250 µl** diluted wash buffer before use. Afterwards dry the microtiter plate on absorbent paper.

1. Add **100 µl** of **CTRL POS/CTRL NEG/ SAMPLEBUF/SAMPLE** (control positive, control negative, sample dilution buffer (blank) and samples (stool suspension)) in duplicate into respective well.
2. Cover and incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature. Alternatively, incubate **overnight** at 2-8° C without shaking.
3. Aspirate and wash the wells **7 x with 250 µl** diluted wash buffer.
4. Add **100 µl** diluted **2.AB** (2nd antibody, biotin-labelled) into each well.
5. Cover and incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer at room temperature.
6. Aspirate and wash the wells **7 x with 250 µl** diluted wash buffer.
7. Add **100 µl** diluted **CONJ** (Conjugate, Peroxidase-labelled) into each well.
8. Cover and incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer at room temperature.
9. Aspirate and wash the wells **7 x with 250 µl** diluted wash buffer.
10. Add **100 µl SUB** (substrate) into each well.
11. Incubate for **5-15 minutes** at room temperature in the dark.
12. Add **50 µl STOP** (stop solution) into each well and mix shortly.
13. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the positive control exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

9. RESULTS

Calculation of the values

Blank absorbance must be < 0.150 . If the absorbance of the blank is higher, the analysis must be repeated.

Test result

Cut off-value = 0,150 at 450/620 nm and 0,190 at 450 nm

Samples with absorbance more than 0,020 (measurement at 450/620 nm) or 0,025 (measurement at 450 nm) above the cut off-value are considered as **positive**.

Samples with an absorbance 0,020 (0,025) below or above the cut off-value are regarded as **border line** samples and must be re-analyzed.

If the value from the repeated measurement is again in the **border line** range, a new sample should be analyzed.

If the value from the repeated measurement is again in the range above the cut off-value, the result is considered as **positive**.

Samples with absorbance more than 0,020 (0,025) under the cut off-value are classified as **negative**.

10. QUALITY CONTROL

The test is correct when the absorption of the negative control at 450 nm is less than 0.190 and at 450/620 nm less than 0.150, and the positive control value at 450 nm greater than 0.54 and at 450/620 nm greater than 0.50. If the observed values differ from the expected, the test must be repeated.

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial available controls for internal quality control.

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity and Specificity

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the test

	%
Clinical sensitivity	97,7
Clinical specificity	96,3
Positive predictive value (PPV)	98,8
Negative predictive value (NPV)	92,9

Samples, n = 113; H. pylori positive, n = 86; H. pylori negative n = 27

12. PRECAUTIONS

- The test kit is for *in vitro* diagnostic use only
- Quality control guidelines should be observed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiry date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

6/4/2008 HELICO_30.06.2005.DOC

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number