



HELICOBACTER PYLORI IgG ELISA

KAPDHPG



HELICOBACTER PYLORI IgG ELISA

en

KAPDHPG
IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgG antibodies to Helicobacter pylori in human plasma and sera. The product is intended for the follow-up of patients showing gastrointestinal pathologies potentially correlated to HP infection. For "in vitro" diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Helicobacter pylori (HP) is a Gram negative bacterium, firstly isolated in gastric mucosa by Marshall and Warren in 1983.

Hp has been recognized to be the agent responsible of most of cases of gastric mucosal damage and to play a role in the evolution of gastric diseases to carcinoma.

Hp causes an immunological response during infection and specific antibodies of the different classes of IgG, IgA and IgM are produced by the patient.

ELISA are currently used to screen patients affected by gastritis or peptic ulcers for acute active infection due to some Helicobacter pylori virulent strains.

In particular the presence of IgA and IgM antibodies is reported to be correlated to the acute phase of illness, while IgG antibodies become present at different titers shortly after primary infections and last in blood for many years.

Quantitative ELISA are also used in the follow-up of patients undergoing antibiotic therapy, useful in monitoring IgG titer variations during and after the pharmaceutical treatment.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with H.pylori immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain.

In the 1st incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti-HP IgG are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-HP IgG are detected by the addition of anti hlgG antibody, labeled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti-HP IgG antibodies present in the sample.

IgG in the sample may therefore be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (arbU/ml) as no international standard is available.

4. COMPONENTS

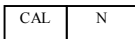
Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.



Microplate

12 strips x 8 microwells coated with HP specific immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain. Plates are sealed into a bag with desiccant.

Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C



Calibrators

Ready to use and color coded standard curve ranging:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml

4 ml CAL2 = 5 arbU/ml

2 ml CAL3 = 10 arbU/ml

2 ml CAL4 = 20 arbU/ml

2 ml CAL5 = 50 arbU/ml

4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.1% Kathon GC as preservatives. Standards are blue colored.



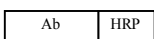
Control Serum

1 vial. Lyophilized. It contains fetal bovine serum proteins, human IgG antibodies to HP at about 20 arbU/ml±20%, 0.3 mg/ml gentamicine sulphate and 0.1% Kathon GC as preservatives.



Wash buffer concentrate

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0±/0.2, 0.05% Tween 20 and 0.05% Kathon GC



Enzyme Conjugate

1x16ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibodies to human IgG, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8±/0.1, 0.1% Kathon GC and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

CHROM	TMB
-------	-----

Chromogen/Substrate

1x16ml/vial. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methylbenzidine (or TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (or H₂O₂).

Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.

STOP	SOLN
------	------

Sulphuric Acid

1x15ml/vial contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Attention !: Irritant (Xi R36/38; S2/26/30)

DIL	SPE
-----	-----

Specimen Diluent

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.1% Kathon GC as preservatives. To be used to dilute the sample.

2 Plate sealing foils

1 Package insert

5. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000 µl, 100 µl, and 10µl) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minutes range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet) set at +37°C (+/-0.5°C tolerance).
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blinking, strongly recommended) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 6 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

7. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
4. Sera and plasma can be stored at +2°.8°C for up to five days after collection. For longer storage periods, samples can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

8. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of conservation.

In this case call DiasourceImmunoAssay's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Calibration Curve

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilized powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: *The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.*

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: *Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.*

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container.

Sample Diluent

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Legend: R 36/38 = Irritating to eyes and skin.

S 2/26/30 = In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

9. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The ELISA washer is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated and correctly optimised using the kit controls and reference panels, before using the kit for routine laboratory tests. Usually 4-5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350µl/well of washing solution = 1 cycle) are sufficient to ensure that the assay performs as expected. A soaking time of 20-30 seconds between cycles is suggested. In order to set correctly their number, it is recommended to run an assay with the kit controls and well characterized negative and positive reference samples, and check to match the values reported below in the section 13 "Internal quality Control". Regular calibration of the volumes delivered by, and maintenance (decontamination and cleaning of needles) of the washer has to be carried out according to the instructions of the manufacturer.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm, strongly recommended) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. DIASource ImmunoAssays's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

10. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Control Serum as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as found in the validation of the instrument for its use with the kit.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

11. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing. The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

11.1 QUANTITATIVE DETERMINATION:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic as reported previously (section 9.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section 9.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, strongly recommended), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

11.2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 5 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section 9.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow .
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section 9.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, strongly recommended), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. If the second filter is not available ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.

12. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control(*)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	4-5 cycles
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	4-5 cycles
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm

(*) Important Notes:

- The Control Serum (CS) it does not affect the test's results calculation.
- The Control Serum (CS) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1									
B	BLK	CAL4	S 2									
C	CAL1	CAL5	S 3									
D	CAL1	CAL5	S 4									
E	CAL2	CAL6	S 5									
F	CAL2	CAL6	S 6									
G	CAL3	CS(*)	S 7									
H	CAL3	CS(*)	S 8									

Legend: BLK = Blank CAL = Calibrator
CS = Control Serum- Not mandatory S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11									
B	CAL1	S 4	S 12									
C	CAL1	S 5	S 13									
D	CAL2	S 6	S 14									
E	CAL2	S 7	S 15									
F	CAL6	S 8	S 16									
G	S1	S 9	S 17									
H	S2	S 10	S 18									

Legend: BLK = Blank CAL = Calibrators
S = Sample

13. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as expected and required by the IVDD directive 98/79/EC.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank Well >0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
CAL 2 5arbU/ml OD450nm<OD450nm CAL 1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml <1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

Note:

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	Mean OD450nm CAL4 +/-20%

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Control Serum Different from expected value	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, CAL1, CAL2, CAL 6), match the established requirements, the test may be considered valid.

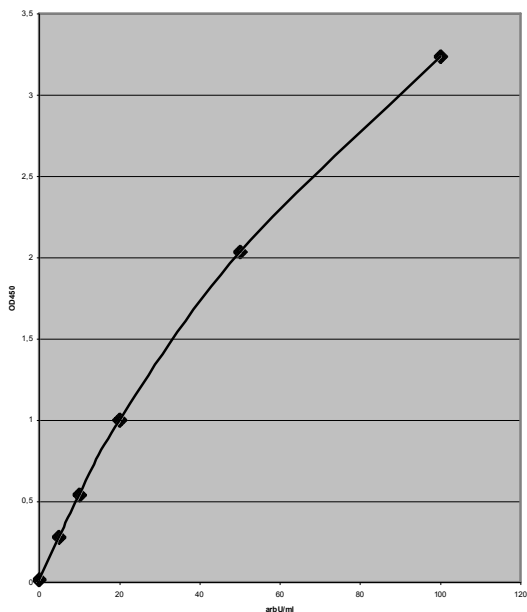
14. Results

14.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm (4-parameters interpolation is suggested).

Then on the calibration curve calculate the concentration of anti H.pylori IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below:



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

14.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm values for the Calibrators 0 and 5 arbU/ml and then check that the assay is valid.

Example of calculation:

Note: *The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.*

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm

Mean Value: 0.022 OD450nm

Lower than 0.150 – Accepted

Calibrator 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm

Mean Value: 0.260 OD450nm

Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm

Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm of the Calibrator 5 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm value of the sample and the OD450nm of the Calibrator 5 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgG in the sample.

15. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 5 arbU/ml are considered negative for anti H.pylori IgG antibody.
Samples with a concentration higher than 5 arbU/ml are considered positive for anti H.pylori IgG antibody.

Important notes:

1. *H.pylori IgG results alone are not enough to provide a clear diagnosis of Helicobacter pylori infection. Other tests for Helicobacter pylori should be carried out.*
2. *Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
3. *When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.*
4. *Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.*

16. PERFORMANCES CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples in an external clinical laboratory with reference to a FDA approved reference kit.

1. Limit of detection

No international standard for HP IgG Antibody detection has been defined so far by the European Community.
In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic sensitivity and specificity

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external center, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with the reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients with a clinical history of H.pylori infection.

The diagnostic specificity was determined on panels of more than 100 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity. No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility

A study conducted on three samples of different HP IgG reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs has shown CV% values ranging 2-18% depending on the OD450nm readings.

The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.

17. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2% of the normal population.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates may generate false positive results.

18. REFERENCES

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.

Revision date : 2015-01-13



HELICOBACTER PYLORI IgG ELISA

es

KAPDHPG

USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 90

1. INDICACIONES

Inmunoensayo enzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgG contra Helicobacter pylori en plasma y suero humanos. El producto está concebido para el seguimiento de pacientes con patologías gastrointestinales potencialmente relacionadas con una infección por Hp.

Solo para uso diagnóstico "in vitro".

2. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (Hp) es una bacteria gramnegativa, aislada por primera vez en la mucosa gástrica por Marshall y Warren en 1983.

Hp se ha identificado como el agente responsable de la mayoría de los casos de daño en la mucosa gástrica y se considera que participa en la evolución de las enfermedades gástricas al carcinoma.

Hp causa una respuesta inmunitaria durante la infección y el paciente produce anticuerpos específicos de las diferentes clases de IgG, IgA e IgM.

En la actualidad se utilizan los ensayos ELISA para el cribado de pacientes con gastritis o úlcera péptica, con el fin de detectar infección aguda activa causada por algunas cepas virulentas de Helicobacter pylori.

En particular, se ha descrito una correlación entre la presencia de anticuerpos IgA e IgM y la fase aguda de la enfermedad, mientras que los anticuerpos IgG aparecen con diferentes valoraciones poco tiempo después de la infección primaria y permanecen en la sangre durante muchos años.

Los ensayos ELISA cuantitativos se utilizan también para el seguimiento de pacientes tratados con antibióticos y son útiles para vigilar las variaciones en la valoración de la IgG durante y después del tratamiento farmacéutico.

3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Se recubren microplacas con antígenos inmunodominantes de H. pylori obtenidos por cultivo de tejidos de una cepa virulenta.

En la primera incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y los antígenos capturan la IgG anti-Hp, si está presente.

Después de lavar los demás componentes de la muestra, en la segunda incubación se detecta la IgG anti-Hp unida mediante la adición de anticuerpos anti-IgA humana marcados con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada en la fase sólida actúa sobre la mezcla de sustrato/cromógeno y genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-Hp presente en la muestra.

De esta forma, es posible cuantificar la IgG en la muestra mediante una curva estándar calibrada en unidades arbitrarias por mililitro (Uarb/ml), ya que no se dispone de un patrón internacional.

4. COMPONENTES

Cada kit contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.



Microplaca

12 tiras x 8 micropocillos recubiertos con antígenos inmunodominantes específicos de Hp obtenidos por cultivo de tejidos de una cepa virulenta. Las placas se sellan dentro de una bolsa con desecante.

Se debe esperar a que la microplaca se equilibre a temperatura ambiente antes de abrirla; las tiras no usadas deben sellarse de nuevo en la bolsa con desecante y conservarse a 4 °C.

CAL	N
-----	---

Calibradores

Listos para usar y codificados con colores; intervalo de la curva estándar:

4 ml CAL1 = 0 Uarb/ml

4 ml CAL2 = 5 Uarb/ml

2 ml CAL3 = 10 Uarb/ml

2 ml CAL4 = 20 Uarb/ml

2 ml CAL5 = 50 Uarb/ml

4 ml CAL6 = 100 Uarb/ml

Los patrones se calibran por comparación con un patrón de referencia interno, o IGS, ya que no se ha definido un patrón internacional.

Contienen proteínas de suero humano, 2 % de caseína, tampón de citrato-Na 10 mM pH 6,0 +/-0,1, 0,1 % de Tween 20, 0,09 % de azida sódica y 0,1 % de Kathon GC como conservantes. Los patrones son de color azul.

CONTROL

Suero control

1 vial. Liofilizado. Contiene proteínas de suero bovino fetal, anticuerpos IgG humanos contra Hp a una concentración de aproximadamente 20 Uarb/ml \pm 20 %, 0,3 mg/ml de sulfato de gentamicina y 0,1 % de Kathon GC como conservantes.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampón de lavado concentrado

1 frasco x 60 ml. Solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM pH 7,0 +/-0,2, 0,05 % de Tween 20 y 0,05 % de Kathon GC.

Ab	HRP
----	-----

Conjugado enzimático

1 vial x 16 ml. Listo para usar; codificado de color rojo. Contiene anticuerpos policlonales conjugados con peroxidasa de rábano picante contra la IgG humana, 5 % de BSA, tampón Tris 10 mM pH 6,8+/-0,1, 0,1 % de Kathon GC y 0,02 % de sulfato de gentamicina como conservantes.

CHROM	TMB
-------	-----

Cromógeno/sustrato

1 vial x 16 ml. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM pH 3,5-3,8, 4 % de dimetilsulfóxido, 0,03 % de tetrametilbencidina (TMB) y 0,02 % de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Nota: conservar protegido de la luz, ya que es sensible a la iluminación intensa.

STOP	SOLN
------	------

Ácido sulfúrico

1 vial x 15 ml que contiene solución de H₂SO₄ 0,3 M.

¡Atención! Irritante (Xi R36/38; S2/26/30)

DIL	SPE
-----	-----

Diluyente de la muestra

2 viales x 60 ml. Contiene 2 % de caseína, tampón de citrato-Na 10 mM pH 6,0 +/-0,1, 0,1 % de Tween 20, 0,09 % de azida sódica y 0,1 % de Kathon GC como conservantes. Se utiliza para diluir la muestra.

2 Cubiertas de sellado de placas

1 Prospecto

5. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000 µl, 100 µl y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar las sustancias químicas oxidantes empleadas como desinfectantes).
3. Cronómetro de 60 minutos o más.
4. Servilletas de papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas de ELISA calibrado (seco o húmedo), configurado a +37 °C (tolerancia de +/- 0,5 °C).
6. Lector de micropocillos de ELISA calibrado, con filtros de 450 nm (lectura) y 620-630 nm (blanco, especialmente recomendado).
7. Lavador de microplacas de ELISA calibrado.
8. Agitador vórtex o similar.

6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El kit solo debe ser utilizado por técnicos con experiencia y debidamente formados, bajo la supervisión del médico responsable del laboratorio.
2. Todo el personal que participe en la realización del ensayo debe utilizar ropa protectora de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Debe evitarse el uso de objetos punzantes (como agujas) o cortantes (como cuchillas). Todo el personal involucrado debe recibir formación sobre los procedimientos de seguridad biológica recomendados por el Center for Disease Control, Atlanta, EE. UU. y descritos en el documento del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. Todo el personal que participe en la manipulación de las muestras debe estar vacunado contra el VHB y el VHA; las vacunas contra estos virus están disponibles, y son seguras y eficaces.
4. El entorno del laboratorio debe controlarse para evitar la presencia de contaminantes, como polvo o microorganismos transportados por el aire, tanto en el momento de abrir los viales y microplacas del kit, como al realizar la prueba. Proteja el cromógeno (TMB) de la luz intensa y evite la vibración de la superficie de trabajo en la que se realiza la prueba.
5. Al recibir el kit, consérvelo a 2 - 8 °C en un frigorífico o cuarto frío con temperatura controlada.
6. No intercambie componentes entre lotes diferentes del kit. Se recomienda no intercambiar tampoco componentes entre dos kits del mismo lote.
7. Compruebe que los reactivos estén transparentes, y no contengan agregados o partículas pesadas visibles. Si no es así, informe al supervisor del laboratorio para iniciar los procedimientos necesarios para la sustitución del kit.
8. Evite la contaminación cruzada entre las muestras de suero/plasma mediante el uso de puntas desechables, que deben cambiarse después de cada muestra.
9. Evite la contaminación cruzada entre los reactivos del kit mediante el uso de puntas desechables, que deben cambiarse después del uso de cada reactivo.
10. No utilice el kit después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del embalaje y de los envases en su interior (viales). En un estudio realizado con un kit abierto no se observó ninguna pérdida de actividad con un máximo de seis (6) usos del producto y hasta 6 meses.
11. Trate todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deben manipularse con un nivel de seguridad biológica 2, tal como recomienda el Center for Disease Control, Atlanta, EE. UU., en cumplimiento de lo indicado en la publicación de los Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. Con el fin de evitar la contaminación cruzada, se recomienda el uso de material de plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos o para transferir componentes a las estaciones de trabajo automatizadas.
13. Los residuos producidos durante el uso del kit deben desecharse de conformidad con las leyes y directivas nacionales referentes a la eliminación de sustancias químicas y biológicas de laboratorio. En particular, los residuos líquidos generados por el procedimiento de lavado, y los restos de controles y de muestras, deben tratarse como material potencialmente infeccioso e inactivarse antes de desecharse. Los procedimientos de inactivación recomendados son el tratamiento con lejía para uso doméstico a una concentración final del 10 % durante 16-18 h o la inactivación térmica en autoclave a 121 °C durante 20 min..
14. Los vertidos accidentales de muestras y de los procedimientos deben adsorberse con servilletas de papel empapadas con lejía para uso doméstico, y después con agua. Las servilletas deben desecharse después en contenedores adecuados, designados para residuos hospitalarios o de laboratorio.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de vertido, lave la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados por el uso del kit (p. ej., las puntas utilizadas para las muestras y los controles, las microplacas usadas) deben tratarse como potencialmente infecciosos, y desecharse de conformidad con las leyes y directivas nacionales referentes a los residuos de laboratorio.

7. MUESTRA: PREPARACIÓN Y ADVERTENCIAS

1. Se extrae la sangre asépticamente por venopunción, y se prepara el suero o el plasma utilizando las técnicas habituales de preparación de muestras para análisis de laboratorios clínicos. No se han observado cambios cuando las muestras se preparan con citrato, EDTA o heparina.
2. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos o nombres, con el fin de evitar la interpretación errónea de los resultados. Se recomienda especialmente el uso de etiquetas de códigos de barras y su lectura electrónica.
3. Las muestras hemolizadas ("rojas") o visiblemente hiperlipémicas ("lechosas") deben desecharse, ya que podrían generar resultados falsos.
Las muestras que contienen residuos de fibrina, partículas pesadas, o cuerpos y filamentos microbianos deben desecharse, ya que podrían generar resultados falsos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a +2 - 8 °C durante un máximo de cinco días después de la recogida. Para su conservación durante más tiempo, las muestras pueden conservarse congeladas a -20 °C durante varios meses. Las muestras congeladas no deben congelarse y descongelarse más de una vez, ya que esto podría generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si la muestra presenta partículas, centrifúguela a 2000 rpm durante 20 min o pásela por un filtro de 0,2-0,8 µm para limpiarla antes de la prueba.

8. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y ADVERTENCIAS

Microplaca:

Espere a que la microplaca se equilibre a la temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el color del desecante no haya cambiado a verde oscuro, lo que indicaría un problema de conservación.

En ese caso, llame al servicio de atención al cliente de DIAsource ImmunoAssays.

Las tiras no usadas deben guardarse de nuevo en la bolsa de aluminio, con el desecante suministrado, bien cerradas y a una temperatura de +2 - 8 °C. Al abrir el envase por primera vez, las tiras restantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad de la bolsa con desecante cambia de amarillo a verde.

Curva de calibración

Componente listo para usar. Mézclelo con cuidado en un agitador vórtex antes de usarlo.

Suero control

Añada el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta al polvo liofilizado; espere a que se disuelva por completo y agítelo suavemente en un vórtex.

Nota: El control no es estable después de la disolución. Consérvelo congelado en alícuotas a -20 °C.

Tampón de lavado concentrado:

Hay que diluir el contenido completo de la solución concentrada 20x con agua bidestilada y mezclar suavemente por inversión antes de utilizar. Durante la preparación, evite la formación de espuma ya que la presencia de burbujas podría afectar a la eficacia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución de lavado es estable durante 1 semana a +2 - 8 °C.

Conjugado enzimático:

Listo para usar. Mézclelo bien con un agitador vórtex antes de usarlo.

Tenga cuidado de no contaminar el líquido con sustancias químicas oxidantes, polvo o microbios presentes en el aire.

Si es necesario transferir este componente, utilice exclusivamente envases de plástico, a poder ser desechables y estériles.

Cromógeno/sustrato:

Listo para usar. Mézclelo bien con un agitador vórtex antes de usarlo.

Tenga cuidado de no contaminar el líquido con sustancias químicas oxidantes, polvo o microbios presentes en el aire.

No lo exponga a la luz intensa, a agentes oxidantes ni a superficies metálicas.

Si es necesario transferir este componente, utilice exclusivamente envases de plástico, a poder ser desechables y estériles.

Diluyente de la muestra:

Componente listo para usar. Mézclelo con cuidado en un agitador vórtex antes de usarlo.

Ácido sulfúrico:

Listo para usar. Mézclelo bien con un agitador vórtex antes de usarlo.

Leyenda: R 36/38 = Irrita los ojos y la piel.

S 2/26/30 = En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua, y acúdase a un médico.

9. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS UTILIZADOS JUNTO CON EL KIT

1. Es necesario calibrar las micropipetas para que dispensen el volumen correcto requerido para el ensayo; también deben descontaminarse periódicamente (con alcohol para uso doméstico, solución de lejía al 10 % y desinfectantes de calidad hospitalaria), en particular las piezas que puedan entrar accidentalmente en contacto con la muestra. Se deben someter a un mantenimiento periódico para mostrar una precisión del 1 % y una exactitud de +/- 2 %. También se debe llevar a cabo periódicamente la descontaminación de los vertidos o los restos de los componentes del kit.
2. El incubador de ELISA debe configurarse a +37 °C (con una tolerancia de +/- 0,5 °C) y comprobarse periódicamente para asegurarse de que se mantiene la temperatura correcta. Para las incubaciones pueden utilizarse tanto incubadores secos como baños de agua, siempre que el instrumento esté validado para utilizarse en la incubación de pruebas de ELISA.
3. El lavador de ELISA es sumamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe validarse cuidadosamente y optimizarse correctamente con los controles y los paneles de referencia del kit antes de utilizar este para las pruebas sistemáticas del laboratorio. Por lo general, 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensación de 350 µl/pocillo de solución de lavado = 1 ciclo) son suficientes para garantizar el rendimiento esperado del ensayo. Se recomienda un tiempo de remojo de 20-30 segundos entre los ciclos. Para configurar el número correctamente, se recomienda realizar un ensayo con los controles del kit y las muestras de referencia positivas y negativas bien caracterizadas, y comprobar la correspondencia con los valores indicados a continuación en el apartado 13 "Control de calidad interno". La calibración periódica de los volúmenes dispensados y el mantenimiento (descontaminación y limpieza de las agujas) del lavador deben llevarse a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Los tiempos de incubación tienen una tolerancia de ± 5 %.
- El lector de microplacas de ELISA debe estar equipado con un filtro de lectura de 450 nm y un segundo filtro (muy recomendable de 620-630 nm) para la resta del blanco. El rendimiento estándar debe ser: a) ancho de banda ≤ 10 nm; b) intervalo de absorbancia de 0 a $\geq 2,0$; c) linealidad hasta $\geq 2,0$; reproducibilidad ≥ 1 %. La resta del blanco se lleva a cabo en el pocillo identificado en el apartado "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse regularmente para asegurarse de medir la densidad óptica correcta. Debe realizarse periódicamente el mantenimiento indicado en las instrucciones del fabricante.
- Cuando se utilice una estación de trabajo automatizada de ELISA, todos los pasos críticos (dispensación, incubación, lavado, lectura, tratamiento de datos) deben configurarse, calibrarse, controlarse y recibir mantenimiento regularmente para que coincidan con los valores indicados en el apartado "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo debe instalarse en el sistema operativo de la unidad y validarse igual que para el lavador y el lector. Además, la parte de manipulación de líquidos (dispensación y lavado) de la estación debe validarse y configurarse correctamente. Se debe prestar especial atención al arrastre producido por las agujas empleadas en la dispensación y el lavado. Este debe estudiarse y controlarse para minimizar el riesgo de contaminación de los pocillos adyacentes. Se recomienda utilizar estaciones de trabajo automatizadas de ELISA cuando el número de muestras a analizar supere las 20-30 unidades por análisis.
- El servicio de atención al cliente de DIAsource ImmunoAssays puede ayudar al usuario a configurar y comprobar los instrumentos que se utilizan junto con el kit, a fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos indicados. También se ofrece asistencia para la instalación de instrumentos nuevos que vayan a utilizarse con el kit.

10. CONTROLES Y OPERACIONES ANTES DEL ENSAYO

- Compruebe la fecha de caducidad del kit, impresa en la etiqueta exterior (envase primario). No utilice el producto si ya ha caducado.
- Compruebe que los componentes líquidos no estén contaminados con agregados o partículas visibles.
- Compruebe que el cromógeno (TMB) esté transparente o de color azul pálido, aspirando una pequeña cantidad con una pipeta de plástico estéril.
- Compruebe que no se haya roto nada durante el transporte y que no haya indicios de líquido derramado dentro de la caja (envase primario). Compruebe que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté perforada ni dañada.
- Disuelva el contenido del suero control tal como se indica.
- Diluya todo el contenido de la solución de lavado concentrada 20x como se describió anteriormente.
- Espere a que todos los demás componentes se equilibren a la temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora) y después mezcle suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Configure el incubador de ELISA a $+37$ °C y prepare el lavador de ELISA, cebando con la solución de lavado diluida conforma a las instrucciones de los fabricantes. Configure el número correcto de ciclos de lavado determinado en la validación del instrumento para su uso con el kit.
- Compruebe que el lector de ELISA esté encendido o asegúrese de que se encenderá como mínimo 20 minutos antes de realizar la lectura.
- Si se está utilizando una estación de trabajo automatizada, enciéndala, compruebe la configuración y asegúrese de utilizar el protocolo correcto para el ensayo.
- Compruebe que las micropipetas estén ajustadas para el volumen requerido.
- Compruebe que todo el resto del equipo esté disponible y listo para utilizarse.
- Si hay cualquier problema, no continúe con la prueba y consulte al supervisor.

11. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe llevarse a cabo según se indica a continuación, teniendo cuidado de mantener el mismo tiempo de incubación para todas las muestras de la prueba.

El kit puede utilizarse para determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

11.1 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

- Diluya las muestras 1:101 en un tubo de dilución correctamente definido (por ejemplo: 1000 μ l de diluyente de la muestra + 10 μ l de muestra). No diluya el conjunto de calibración, ya que los calibradores están listos para utilizarse. Mezcle con cuidado todos los componentes líquidos en un vórtex y después continúe como se indica a continuación.
- Coloque el número de micropocillos necesario en el soporte de micropocillos. Deje los pocillos A1 y B1 vacíos para el blanco.
- Dispense 100 μ l de los calibradores y 100 μ l de suero control por duplicado. A continuación, dispense 100 μ l de muestra diluida en cada pocillo debidamente identificado.
- Incuba la microplaca durante **60 min a $+37$ °C**.

Nota importante: Solo es necesario sellar las tiras con las cubiertas adhesivas de sellado suministradas cuando la prueba se lleva a cabo manualmente. No cubra las tiras cuando se utilicen instrumentos de ELISA automáticos.

- Lave la microplaca con un lavador automático, como se indicó anteriormente (apartado 9.3).
- Pipeteo 100 μ l de conjugado enzimático en cada pocillo, excepto en los pocillos de blanco A1+B1, y cubra con el sellador. Compruebe que se ha dispensado este componente de color rojo en todos los pocillos, con excepción de A1 y B1.

Nota importante: Tenga cuidado de no tocar la superficie interior de plástico del pocillo con la punta cargada con conjugado enzimático. Podría producirse contaminación.

- Incuba la microplaca durante **60 min a $+37$ °C**.
- Lave los micropocillos como en el paso 5.
- Pipeteo 100 μ l de mezcla de cromógeno/sustrato en cada pocillo, incluidos los pocillos de blanco A1 y B1. Después incuba la microplaca a **temperatura ambiente ($18-24$ °C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No la exponga a la luz intensa directa. Esto podría aumentar el fondo.

- Pipeteo 100 μ l de ácido sulfúrico para detener la reacción enzimática en todos los pocillos, utilizando la misma secuencia de pipeteo que en el paso 9. La adición de ácido hará que los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas cambien de azul a amarillo.
- Mida la intensidad del color de la solución en cada pocillo, tal como se describe en el apartado 9.5, con el filtro de 450 nm (lectura) y con el filtro de 620-630 nm (resta del fondo especialmente recomendada), y ajuste el instrumento utilizando como blanco el pocillo A1, B1 o ambos.

11.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Si solo necesita una determinación cualitativa, proceda como se indica a continuación:

1. Diluya las muestras 1:101 en un tubo de dilución correctamente definido (por ejemplo: 1000 µl de diluyente de la muestra + 10 µl de muestra). No diluya el conjunto de calibración, ya que los calibradores están listos para utilizarse. Mezcle con cuidado todos los componentes líquidos en un vórtex y después continúe como se indica a continuación.
2. Coloque el número de micropocillos necesario en el soporte de micropocillos. Deje el pocillo A1 vacío para el blanco.
3. Dispense 100 µl del calibrador de 0 Uarb/ml y del calibrador de 5 Uarb/ml por duplicado, y del calibrador de 100 Uarb/ml en un solo pocillo. A continuación, dispense 100 µl de muestra diluida en cada pocillo debidamente identificado.
4. Incube la microplaca durante **60 min a +37 °C**.

Nota importante: Solo es necesario sellar las tiras con las cubiertas adhesivas de sellado suministradas cuando la prueba se lleva a cabo manualmente. No cubra las tiras cuando se utilicen instrumentos de ELISA automáticos.

5. Lave la microplaca con un lavador automático, como se indicó anteriormente (apartado 9.3).
6. Pipetee 100 µl de conjugado enzimático en cada pocillo, excepto en el pocillo A1, y cubra con el sellador. Compruebe que se ha dispensado este componente de color rojo en todos los pocillos, con excepción de A1.

Nota importante: Tenga cuidado de no tocar la superficie interior de plástico del pocillo con la punta cargada con conjugado enzimático. Podría producirse contaminación.

7. Incube la microplaca durante **60 min a +37 °C**.
8. Lave los micropocillos como en el paso 5.
9. Pipetee 100 µl de mezcla de cromógeno/sustrato en cada pocillo, incluido el pocillo de blanco. Después, incube la microplaca a **temperatura ambiente (18-24 °C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No la exponga a la luz intensa directa. Esto podría aumentar el fondo.

10. Pipetee 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos, utilizando la misma secuencia de pipeteo que en el paso 9. La adición de ácido hará que los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas cambien de azul a amarillo.
11. Mida la intensidad del color de la solución en cada pocillo, tal como se describe en el apartado 9.5, con el filtro de 450 nm (lectura) y con el filtro de 620-630 nm (resta del fondo, especialmente recomendada), y ajuste el instrumento utilizando como blanco el pocillo A1.

Notas generales importantes:

1. Si no dispone del segundo filtro, asegúrese de que no haya huellas dactilares en la base del micropocillo antes de realizar la lectura a 450 nm. Las huellas dactilares pueden dar lugar a resultados positivos falsos durante la lectura.

12. PLAN DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Calibradores y control(*)	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	4-5 ciclos
Conjugado enzimático	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	4-5 ciclos
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	Ambiente
Ácido sulfúrico	100 µl
DO de lectura	450nm

(*) Notas importantes:

- El suero control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba.
- El suero control (CS) únicamente se utiliza si la dirección exige el uso de un control de calidad interno del laboratorio.

A continuación se muestra un ejemplo del plan de dispensación para un análisis cuantitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1									
B	BLK	CAL4	S 2									
C	CAL1	CAL5	S 3									
D	CAL1	CAL5	S 4									
E	CAL2	CAL6	S 5									
F	CAL2	CAL6	S 6									
G	CAL3	CS(*)	S 7									
H	CAL3	CS(*)	S 8									

Leyenda: BLK = Blanco CAL = Calibrador
CS = Suero control - no obligatorio S = Muestra

A continuación se muestra un ejemplo del plan de dispensación para un análisis cualitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11									
B	CAL1	S 4	S 12									
C	CAL1	S 5	S 13									
D	CAL2	S 6	S 14									
E	CAL2	S 7	S 15									
F	CAL6	S 8	S 16									
G	S1	S 9	S 17									
H	S2	S 10	S 18									

Leyenda: BLK = Blanco CAL = Calibradores
S = Muestra

13. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

En cualquier momento que se utilice el kit se lleva a cabo una comprobación de la validación con los controles y el calibrador, con el fin de verificar que el rendimiento del ensayo es el esperado y requerido conforme a la directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro (IVDD).

Controle que los siguientes datos coincidan:

Comprobar	Requisitos
Pocillo de blanco	Valor de DO 450 nm < 0,100
CAL 1 0 Uarb/ml	Valor medio de DO 450 nm < 0,150 después de restar el blanco Coeficiente de variación < 30 %
CAL 2 5 Uarb/ml	DO 450 nm > DO 450 nm CAL1 + 0,100
CAL 6 100 Uarb/ml	DO 450 nm > 1,000

Si los resultados de la prueba coinciden con los requisitos anteriores, pase al siguiente apartado.

En caso contrario, no continúe y haga lo siguiente:

Problema	Comprobar
Pocillo de blanco DO 450 nm > 0,100	1. Que la solución de cromógeno/sustrato no se haya contaminado durante el ensayo
CAL 1 0 Uarb/ml DO 450 nm > 0,150 después de restar el blanco Coeficiente de variación > 30 %	1. Que el procedimiento de lavado y la configuración del lavador sigan igual que cuando se validaron en el estudio de precalificación; 2. Que se haya utilizado la solución de lavado correcta y que el lavador se haya cebado con esta solución antes de usarlo; 3. Que no se haya cometido ningún error en el procedimiento del ensayo (p. ej., dispensación de un calibrador positivo en vez del negativo); 4. Que el calibrador negativo o sus pocillos no se hayan contaminado con derrames de muestras positivas o del conjugado enzimático; 5. Que las microplacas no se hayan contaminado con las muestras positivas o con el conjugado enzimático 6. Que las agujas del lavador no estén bloqueadas o parcialmente obstruidas.
CAL 2 5 Uarb/ml DO 450 nm < DO 450 nm CAL 1 + 0,100	1. Que el procedimiento se haya llevado a cabo correctamente; 2. Que no haya habido errores en la distribución (p. ej., dispensación de un calibrador incorrecto); 3. Que el procedimiento de lavado y la configuración del lavador sigan igual que cuando se validaron en el estudio de precalificación; 4. Que no haya habido contaminación externa del calibrador.

CAL 6 100 Uarb/ml DO 450 nm < 1,000	<ol style="list-style-type: none"> 1. Que el procedimiento se haya llevado a cabo correctamente; 2. Que no haya habido errores en la distribución (p. ej., dispensación de un calibrador incorrecto); 3. Que el procedimiento de lavado y la configuración del lavador sigan igual que cuando se validaron en el estudio de precalificación; 4. Que no haya habido contaminación externa del control positivo.
---	--

En caso de que haya ocurrido alguno de estos problemas, después de comprobarlo, comuníquelo al supervisor para determinar qué medidas adicionales hay que tomar.

Nota:

Si se ha utilizado el suero control, verifique los siguientes datos:

Comprobar	Requisitos
Suero control	DO 450 nm media del CAL4 ± 20%

Si los resultados de la prueba no cumplen los requisitos indicados anteriormente, haga lo siguiente:

Problema	Comprobar
Suero control Diferente del valor esperado	<ol style="list-style-type: none"> 1. Que el procedimiento se haya llevado a cabo correctamente; 2. Que no haya habido errores en la distribución (p. ej., dispensación de un calibrador incorrecto); 3. Que el procedimiento de lavado y la configuración del lavador sigan igual que cuando se validaron en el estudio de precalificación; 4. Que no haya habido contaminación externa del control.

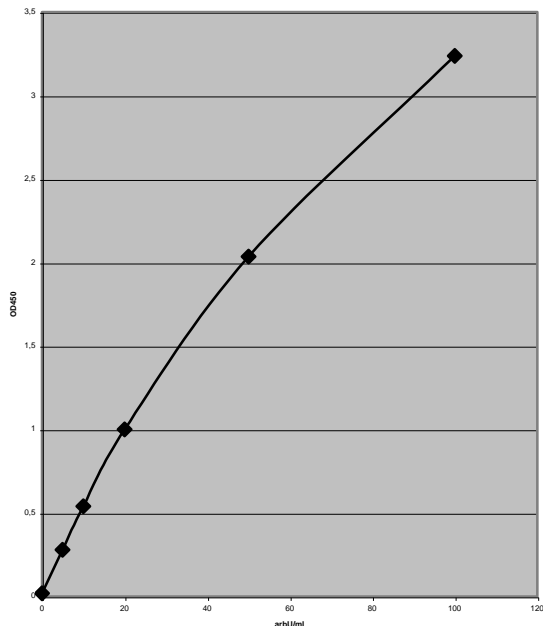
En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, CAL 1, CAL 2, CAL 6) cumplen los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

14. Resultados

14.1 Método cuantitativo

Si la prueba es válida, utilice para el método cuantitativo un programa de ajuste de curvas aprobado para trazar la curva de calibración a partir de los valores obtenidos al leer a 450 nm (se sugiere una interpolación de 4 parámetros). Después, calcular en la curva de calibración la concentración de anticuerpos IgG contra *H. pylori* en las muestras.

A continuación se muestra un ejemplo de una curva de calibración:



Nota importante:

No utilice la curva de calibración anterior para realizar los cálculos.

14.2 Método cualitativo

En el método cualitativo, calcule los valores medios de DO 450 nm para los calibradores de 0 y 5 Uarb/ml, y después compruebe que el ensayo sea válido.

Ejemplo del cálculo:

Nota: No deben utilizarse los siguientes datos en lugar de las cifras reales obtenidas por el usuario.

Calibrador de 0 Uarb/ml: DO 450 nm 0,020 – 0,024

Valor medio: DO 450 nm 0,022

Menor que 0,150 – Aceptado

Calibrador de 5 Uarb/ml: DO 450 nm 0,250 – 0,270

Valor medio: DO 450 nm 0,260

Mayor que el Cal 0 + 0,100 – Aceptado

Calibrador de 100 Uarb/ml: DO 450 nm 2,045

Mayor que 1,000 – Aceptado

La DO 450 nm del calibrador de 5 Uarb/ml se considera el valor de corte (Co) del sistema.

La proporción entre el valor DO 450 nm de la muestra y la DO 450 nm del calibrador de 5 Uarb/ml (o S/Co) puede proporcionar una estimación semicuantitativa del contenido de IgG específica en la muestra.

15. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras con una concentración inferior a 5 Uarb/ml se consideran negativas para anticuerpos IgG anti H.pylori.
Las muestras con una concentración superior a 5 Uarb/ml se consideran positivas para anticuerpos IgG anti H.pylori.

Notas importantes:

1. Los resultados de IgG contra H.pylori no son, por sí mismos, suficientes para proporcionar un diagnóstico claro de infección por Helicobacter pylori. Se deben llevar a cabo otras pruebas de detección de Helicobacter pylori.
2. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio o interpretaciones incorrectas.
3. Cuando se transmitan los resultados del laboratorio a otro centro, se debe prestar atención para evitar la transferencia de datos erróneos.
4. Un médico cualificado adecuado debe realizar el diagnóstico y comunicarlo al paciente.

16. EFICACIA DIAGNÓSTICA

La evaluación de la eficacia diagnóstica se llevó a cabo en un laboratorio clínico externo con paneles de muestras positivas y negativas, utilizando como referencia un kit aprobado por la FDA.

1. Límite de detección

La Comunidad Europea no ha definido hasta el momento un patrón internacional para la detección de anticuerpos IgG contra Hp. En ausencia de este patrón, se ha definido un patrón de referencia interno (IGS) a partir de un paciente con antecedentes de infección anterior por Hp, con el fin de proporcionar al producto una sensibilidad constante y excelente.

2. Sensibilidad y especificidad diagnósticas

La eficacia diagnóstica se evaluó en un estudio de evaluación del rendimiento realizado en un centro externo con una excelente trayectoria en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La sensibilidad diagnóstica se estudió con más de 50 muestras con resultados positivos obtenidos previamente con el kit de referencia de origen europeo utilizado en el laboratorio. Las muestras positivas se obtuvieron de pacientes con antecedentes clínicos de infección por H. pylori.

La especificidad diagnóstica se determinó con paneles de más de 100 muestras negativas de personas normales y donantes de sangre, clasificados como negativos con el kit de referencia, incluidas muestras potencialmente interferentes.

Para determinar la especificidad se utilizó tanto plasma, obtenido mediante diferentes técnicas estándar de preparación (citrato, EDTA y heparina), como suero. No se observó reactividad falsa debido al método de preparación de la muestra.

También se evaluaron muestras congeladas para determinar si la congelación de las muestras interfería con el rendimiento de la prueba. No se observó interferencia cuando se utilizaron muestras limpias y sin partículas.

La evaluación de la eficacia diagnóstica arrojó los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Reproducibilidad

En un estudio realizado con tres muestras de diferente reactividad de IgG anti Hp, analizadas en 16 réplicas en tres ensayos diferentes, se obtuvieron valores del %CV entre el 2 y el 18 %, dependiendo de las lecturas de DO 450 nm.

La variabilidad mostrada en las tablas no dio lugar a la clasificación errónea de las muestras.

17. LIMITACIONES

Se ha evaluado la presencia de positivos falsos en menos del 2% de la población normal.

Las muestras congeladas que contienen agregados o partículas de fibrina pueden generar resultados positivos falsos.

18. BIBLIOGRAFÍA

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et al.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.

Fecha de revisión: 13-01-2015