

HP IgA

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the quantitative/qualitative
determination of IgA antibodies to
Helicobacter pylori
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HP IgA

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgA antibodies to *Helicobacter pylori* in human plasma and sera. The product is intended for the follow-up of patients showing gastrointestinal pathologies referable to *H.pylori* infection.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. 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

C. 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 IgA are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-HP IgA are detected by the addition of anti hlgA 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 IgA antibodies present in the sample.

IgA 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.

Neutralization of IgG anti-HP, carried out directly in the well, is performed in the assay in order to block interferences due to this class in the determination of IgA.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: 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.

2. Calibration Curve: CAL N° ...

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 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue color coded.

3. Control Serum: CONTROL ...ml

1 vial. Lyophilized. It contains fetal bovine serum proteins, human IgA antibodies to HP at about 20 arbU/ml±20%, 0.3 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate: CONJ

1x16ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibodies to human IgA, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

8. Specimen Diluent: DILSPE

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 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

9. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. Ready-to-use Reagent. It contains goat anti hlgG, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

10. Plate sealing foils n°2

11. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000, 100 and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute 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 (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. 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-borne 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. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
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 3 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.

G. 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 in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 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 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. 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 storage.

In this case call Dia.Pro'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 lyophilised 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.

Neutralizing Reagent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. 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 in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
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, mandatory) 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. Dia.Pro'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.

L. 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 manufacturer's instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
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.

M. 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.

M1. 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 50 µl of the Neutralizing Reagent (SOLN NTR) in all the wells of the samples. Do not add it in the wells used for the Calibrators and the Control Serum !

Important note: *The Neutralizing Reagent is able to block false positive reactions due to RF. Positive samples in internal QC panels might be detected negative if such samples were tested positive with an IVD that does not carry out any RF blocking reaction.*

4. Then dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
5. 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.*

6. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
7. 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.*

8. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
9. Wash microwells as in step 5.
10. 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.*

11. 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.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M2. 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 50 µl of the Neutralizing Reagent (SOLN NTR) in all the wells of the samples. Do not add it in the wells used for the Calibrators !

Important note: *The Neutralizing Reagent is able to block false positive reactions due to RF. Positive samples in internal QC panels might be detected negative if such samples were tested positive with an IVD that does not carry out any RF blocking reaction.*

4. 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.
5. 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.*

6. Wash the microplate with an automatic as reported previously (section I.3).
7. 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.*

8. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
9. Wash microwells as in step 6.
10. 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.*

11. 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.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. *Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.*
2. *Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.*

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Neutralizing Reagent (only for samples)	50 µl
Calibrators & Control(*)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20'' of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min

Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-630nm

(* Important Notes:

- The Control Serum (CS) 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	S1									
B	BLK	CAL4	S2									
C	CAL1	CAL5	S3									
D	CAL1	CAL5	S4									
E	CAL2	CAL6	S5									
F	CAL2	CAL6	S6									
G	CAL3	CS(*)	S7									
H	CAL3	CS(*)	S8									

Legenda: 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	S3	S11									
B	CAL1	S4	S12									
C	CAL1	S5	S13									
D	CAL2	S6	S14									
E	CAL2	S7	S15									
F	CAL6	S8	S16									
G	S1	S9	S17									
H	S2	S10	S18									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators
S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

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 5 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (e.g.: 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.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

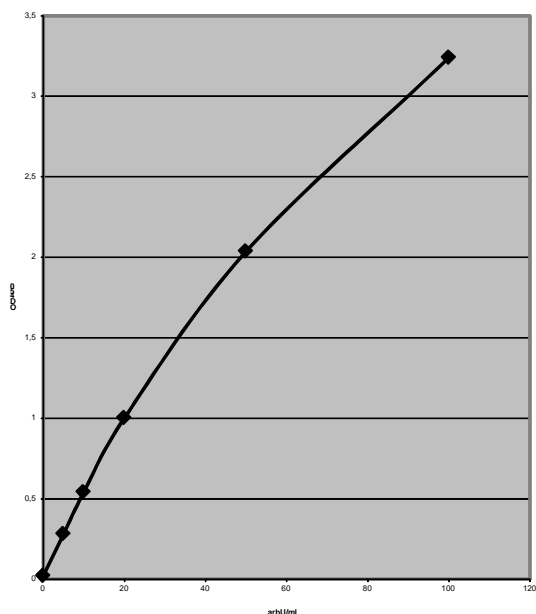
P. RESULTS

P.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/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested).

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

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Calibrators 0 and 5 arbU/ml and then check that the assay is valid.

Example of calculation (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 12):

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/620-630nm of the Calibrator 5 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm/620-630nm value of the sample and the OD450nm/620-630nm of the Calibrator 5 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgG in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

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

Important notes:

1. *H.pylori IgA results alone are not enough to provide a clear diagnosis of Helicobacter pylori infection. Other tests for Helicobacter pylori (supplied by Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. at code n° HPAG.CE, HPG.CE and HPM.CE), 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.*

R. PERFORMANCE 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 IgA 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 HP 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 in an external study 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 in an external study 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.

In addition 35 cross-reacting specimens were studied internally to verify absence of interference on the assay results.

No interference was observed (100% specificity).

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 external Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility:

A study conducted on three samples of different HP IgA reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs has

shown CV% values ranging 7-18% depending on the OD450nm/620-630nm readings.
The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.

S. 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.

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.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



HP IgA

**Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para
la determinación cuantitativa/cualitativa
de anticuerpos IgA frente a
Helicobacter pylori
en suero y plasma humano**

Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF HPA.CE
96 pruebas

HP IgA

A. OBJETIVO DEL ESTUCHE

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgA frente a *Helicobacter pylori* en suero y plasma humano. El producto ha sido diseñado para el estudio de pacientes que muestran patología gastrointestinal producida por infección de *H. pylori*.

Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.

B. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (HP) es una bacteria Gram negative que fue aislada en mucosa gástrica por Marshall y Warren en 1983.

Hp ha sido descrita como el agente causante de la mayoría de casos de daño en la mucosa gástrica, jugando un papel importante en la evolución de enfermedad gástrica a carcinoma. La infección por HP produce una respuesta inmune del paciente con la producción de anticuerpos específicos IgA, IgA e IgM.

Ensayos inmunoenzimáticos son usados en la determinación de pacientes afectados con gastritis o úlceras pépticas producidas por infecciones agudas de cepas virulentas de *Helicobacter pylori*.

Se ha descrito que la presencia de anticuerpos IgA e IgM están correlacionados con fases agudas de la enfermedad, mientras que la presencia de anticuerpos IgG se encuentran a diferentes niveles poco tiempo después de la primera infección, manteniéndose en sangre durante algunos años.

ELISA cuantitativos también son usados en el estudio de pacientes con tratamiento de antibióticos, muy útil en el seguimiento de niveles de IgG durante y después del tratamiento farmacéutico.

C. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con antígenos inmunodominantes de *H. pylori* procedentes de cultivos titulares de una cepa virulenta.

En la 1ª incubación, la fase sólida es tratada con muestras diluidas y los anticuerpos anti-HP IgA quedan unidos a los antígenos de la fase sólida.

Después de lavar, los componentes de la muestra que no se hayan unido son eliminados. En la 2ª incubación, los anticuerpos anti-HP IgA unidos son detectados por la adición de anticuerpos anti-IgA humana marcados con peroxidasa (HRP).

La enzima queda capturada en la fase sólida y actúa sobre el cromógeno/substrato, la actividad de la enzima genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-HP IgA presente en la muestra.

La cantidad de IgA presente en la muestra es cuantificada usando una curva estándar calibrada en unidades arbitrarias por mililitro (Uarb/ml).

La neutralización de anticuerpos anti-HP IgG es necesaria para eliminar interferencias en la determinación de IgA. La neutralización se realiza directamente en los pocillos.

D. COMPONENTES

Cada estuche posee los reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: **MICROPLATE**

12 tiras x 8 pocillos unidos a antígenos inmunodominantes de HP procedentes de cultivos en tejidos de una cepa virulenta de HP. Las placas están selladas en bolsas que contienen desecantes.

Permitir que las microplacas alcancen la temperatura ambiente antes de abrir; sellar las tiras no usadas en la bolsa con desecantes y conservar a 4°C

2. Curva de Calibración: **CAL N° ...**

Listo para el uso y codificados con color estándar rangos de curva:

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 CAL 5 = 50 arbU/ml

4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Los estándares están calibrados según un interno Gold Standard or IGS ya que no se ha definido uno internacional.

Contiene proteínas de suero humano, 2% caseína, 10mM tampón citrato sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes. Los estándares están codificados con color azul.

3. Suero Control: **CONTROL ...ml**

1 vial. Liofilizado.

Contiene proteínas de suero bovino fetal, anticuerpos IgA humanos frente a HP a 20 Uarb/ml±20%, 0.3 mg/ml sulfato de gentamicina y 0.045% ProClin 300 como conservantes.

4. Tampón de lavado concentrado: **WASHBUF 20X**

1x60ml/botella 20x solución concentrada.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM pH 7.0±0.2, 0.05% Tween 20 y 0.045% ProClin 300.

5. Enzima conjugada: **CONJ**

1x16ml/vial. Listo para usar y codificada con el color rojo. Contiene anticuerpos policlonales que reconocen IgA humana y están marcados con peroxidasa de rábano, 5% BSA, 10 mM de tampón Tris pH 6.8±0.1, 0.045% ProClin 300 y 0.02% de sulfato de gentamicina como conservantes.

6. Cromogeno/Substrato: **SUBS TMB**

1x16ml/vial.

Contiene 50 mM tampón citrato-fosfato pH 3.5-3.8, 4% dimetilsulfóxido, 0.03% tetra-methyl-benzidina (TMB) y 0.02% peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Nota: Evitar la exposición a la luz, es fotosensible.

7. Ácido sulfúrico: **H2SO4 0.3M**

1x15ml/vial, contiene solución 0.3 M H₂SO₄.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

8. Diluyente de muestras: **DILSPE**

2x60ml/vial. Contiene 2% caseína, 10 mM tampón citrato sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes. Usar para diluir las muestras.

9. Reactivo Neutralizante: **SOLN NEUT**

1x8ml/vial. Listo para usar. Contiene anticuerpos de cabra anti IgG humana, 2% caseína, 10 mM tampón citrato sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes.

10. Sellador adhesivo n°2

11. Libro de instrucciones n°1

E. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000ul, 100 y 10ul) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar agentes químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Reloj con un rango de 60 minutos o más.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA (seco o húmedo) capaz de alcanzar una temperatura de 37°C (+/- 0.5°C).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de filtros de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Agitador o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El estuche debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser entrenado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los estuches, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/ substrato a la luz y también las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el estuche a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes estuches.
7. Comprobar que los reactivos son transparentes y no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. En caso contrario, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el estuche.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/ plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del estuche usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el estuche e internamente en los reactivos. Un estudio dirigido a comprobar la actividad de estuches abiertos, no mostró pérdida de actividad en estuches usados hasta 6 veces en un periodo de 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del estuche deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados antes de tirar. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del estuche (por ejemplo: puntas usadas en la

manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el estuche se emplea para el pesquisaje en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Curva calibración:

Componentes listos para usar. Mezclar cuidadosamente con agitador antes de usar.

Suero control:

Añadir el volumen de agua de ELISA, indicada en la marca, dejar disolver y mezclar con agitador.

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

Tampón de lavado concentrado:

Todo el contenido del tampón concentrado 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Enzima conjugada:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromogeno/Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Reactivo Neutralizante:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS USADAS EN COMBINACIÓN CON EL ESTUCHE

- Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol, lejía 10%, desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del estuche.
- El incubador de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación

con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

- Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda <= 10nm b) Rango de absorbancia de 0 a >=2.0, c) Linealidad >=2.0, reproducibilidad >=1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de ELISA cuando el número de muestras para analizar supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el estuche, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. CONTROLES Y OPERACIONES PREVIAS AL ENSAYO

- Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del estuche (envase primario). No usar si ha caducado.
- Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
- Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
- Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
- Disolver totalmente el contenido del Suero Control, como se ha descrito anteriormente.
- Diluir totalmente el tampón de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
- Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
- Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de trabajar automáticamente, conectar el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.

11. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
12. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
13. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

El estuche puede ser usado para determinaciones cuantitativas y cualitativas.

M1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

1. Diluir las muestras 1:101 dentro de un apropiado tubo (ejemplo: 1000 µl Diluyente de muestras + 10 µl muestra). No diluir el grupo de Calibración ya que están listos para usarse. Mezclar todos los reactivos líquidos en un agitador y continua como se describe a continuación.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar el primer pocillo A1 y B1 vacío para el blanco.
3. Dispensar 50 µl del Reactivo Neutralizante (SOLN NTR) en todos los pocillos de las muestras. ¡No añadirlo dentro de los pocillos usados para los Calibradores y el Suero Control!

Nota importante: *El reactivo neutralizante puede bloquear falsas reacciones positivas debido a RF. Las muestras positivas en paneles de control de calidad internos podrían ser detectadas como negativas si estas muestras se analizaron como positivas con un IVD que no realiza ninguna reacción de bloqueo de RF.*

4. Dispensar 100 µl de Calibrador y 100 µl de Suero Control por duplicado. Una vez hecho esto, añadir 100 µl de las muestras diluidas en cada uno de los pocillos marcados específicamente.
5. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C.**

Nota importante: *Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el test manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.*

6. Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando según se indica (sección I.3).
7. Dispensar 100µL de la Enzima Conjugada en todos los pocillos, excepto en el A1y B1, y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

Nota importante: *Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.*

8. Incubar la microplaca **60 min a +37°C.**
9. Lavar los pocillos como en el paso 6.
10. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1 y B1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos.**

Nota importante: *No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.*

11. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del calibrador positivo, el suero control y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del

fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 o B1 o ambos (blanco).

M2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Para realizar una determinación cualitativa, proceder como se describe a continuación:

1. Diluir las muestras 1:101 dentro de un apropiado tubo (ejemplo: 1000 µl Diluyente de muestras + 10 µl muestra). No diluir el Set Calibrador ya que están listos para usarse. Mezclar todos los reactivos líquidos en un agitador y continua como se describe a continuación.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar el primer pocillo (A1) vacío para el blanco.
3. Dispensar 50 µl del Reactivo Neutralizante (SOLN NTR) en todos los pocillos de las muestras. ¡No añadirlo dentro de los pocillos usados para los calibradores!

Nota importante: *El reactivo neutralizante puede bloquear falsas reacciones positivas debido a RF. Las muestras positivas en paneles de control de calidad internos podrían ser detectadas como negativas si estas muestras se analizaron como positivas con un IVD que no realiza ninguna reacción de bloqueo de RF.*

4. Dispensar 100 µl de Calibrador 0Uarb/ml y Calibrador 5Uarb/ml por duplicado y Calibrador 100Uarb/ml en un solo pocillo. Una vez hecho esto, añadir 100 µl de las muestras diluidas en cada uno de los pocillos marcados específicamente.
5. Incubar la microplaca durante **60min a +37°C.**

Nota importante: *Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el test manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.*

6. Lavar la microplaca con el lavador automático como se indicó previamente (Sección I.3).
7. Dispensar 100uL de la Enzima Conjugada en todos los pocillos, excepto en el A1 y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

Nota importante: *Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.*

8. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C.**
9. Lavar los pocillo como en el paso 6.
10. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el blanco. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos.**

Nota importante: *No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.*

11. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color de los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas importantes:

1. *Asegurarse de que no hay impresiones digitales ni polvo en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.*
2. *La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría*

producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO:

Método	Operaciones
Reactivo Neutralizante (sólo para muestras)	50 µl
Calibradores y Control(*)	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Enzima conjugada	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	18°-24°C
Ácido sulfúrico	100 ul
Lectura DO	450nm/620-630 nm

(*) Notas importantes:

- El suero de control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba.
- El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M1									
B	BL	CAL4	M2									
C	CAL1	CAL5	M3									
D	CAL1	CAL5	M4									
E	CAL2	CAL6	M5									
F	CAL2	CAL6	M6									
G	CAL3	SC(*)	M7									
H	CAL3	SC(*)	M8									

Legenda: BL= Blanco CAL= Calibrador
SC(*)= Suero Control - No obligatorio M= Muestra

A continuación se describe un ejemplo del esquema en un ensayo cualitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M3	M11									
B	CAL1	M4	M12									
C	CAL1	M5	M13									
D	CAL2	M6	M14									
E	CAL2	M7	M15									
F	CAL6	M8	M16									
G	M1	M9	M17									
H	M2	M10	M18									

Legenda: BL= Blanco CAL = Calibradores
M= Muestra

O. CONTROL INTERNO DE CALIDAD

Se realiza un grupo de pruebas con los controles cada vez que se usa el estuche para verificar si los valores DO 450nm/620-630nm son los esperados.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	Valor < 0.100 DO 450nm
CAL 1 0 Uarb/ml	Media valor < 0.150 DO 450nm después del blanco Coeficiente de variación < 30%
CAL 2 5 Uarb/ml	DO 450nm > DO 450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 Uarb/ml	DO 450nm > 1.000

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100 DO 450nm	1. La solución Cromogeno/Substrato no se ha contaminado durante el ensayo
CAL 1 0 Uarb/ml > 0.150 DO 450nm después del blanco coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el calibrador positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del calibrador negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
CAL 2 5 Uarb/ml DO 450nm < DO 450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un calibrador incorrecto). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.
CAL 6 100 Uarb/ml < 1.000 DO 450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un calibrador incorrecto). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de la comprobación, informe al supervisor para tomar las medidas pertinentes.

** Notas

Si se ha usado suero de control, comprobar los siguientes datos:

Parámetro	Exigencia
Suero Control	valor medio de DO450nm CAL4 +/-20%

Si los resultados de la prueba no se corresponden con los requisitos indicados anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Compruebe que
Suero Control Diferente de los valores esperados	<ol style="list-style-type: none"> 1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un calibrador incorrecto). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control.

En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, CAL1, CAL2, CAL6) se corresponden con los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

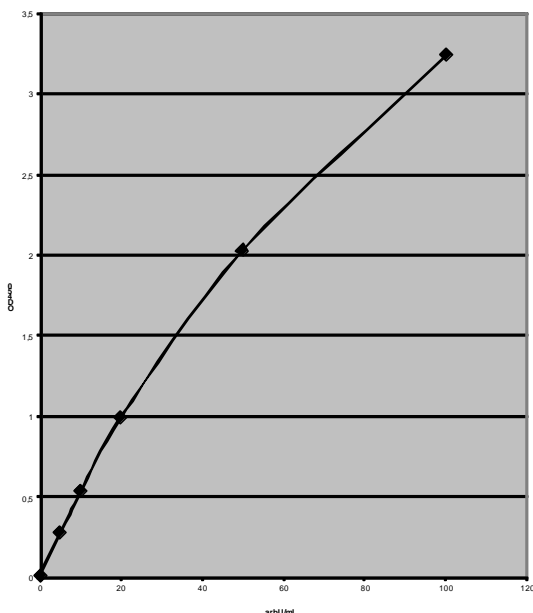
Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

P. RESULTADOS

P.1 Método Cuantitativo

Para la determinación cuantitativa se hace necesario usar un programa adecuado para dibujar una curva de calibrado con los valores obtenidos de la lectura a 450nm/620-630nm. La concentración de anticuerpos anti-*H.Pylori* presente en las muestras se calculará utilizando la curva de calibración. Un ejemplo de Curva de Calibración se muestra a continuación:



Nota Importante: No usar esta curva de calibración para hacer los cálculos.

P.2 Método Cualitativo

En el método cualitativo, calcula la media de los valores DO 450nm/620-630nm del calibrador 0 y 5 Uarb/ml y comprueba que el ensayo es válido.

Ejemplo de cálculos (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12).

Nota: Los siguientes datos no deben ser usados en lugar de los datos reales obtenidos.

Calibrador 0 Uarb/ml: 0.020 – 0.024 DO 450nm
 Media Valor: 0.022 DO 450nm
 Menor que 0.150 – Aceptado

Calibrador 5 Uarb/ml: 0.250 – 0.270 DO 450nm
 Media Valor: 0.260 DO 450nm
 Mayor que Cal 0 + 0.100 – Aceptado

Calibrador 100 Uarb/ml: 2.045 DO 450nm
 Mayor que 1.000 – Aceptado

La DO 450nm/620-630nm del Calibrador 5 Uarb/ml es considerado el valor del corte (cut-off o Co).

La relación entre el valor de DO 450nm/620-630nm de la muestra y la DO450nm/620-630nm del Calibrador 5 Uarb/ml (o M/Co) puede dar información semi-cuantitativa de la cantidad de IgG de la muestra.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Muestras con una concentración menor de 5 Uarb/ml son consideradas negativas para la presencia de anticuerpos anti-*H.pylori* IgA.-4

Muestras con una concentración mayor de 5 Uarb/ml son consideradas positivas para la presencia de anticuerpos anti-*H.pylori* IgA.

Notas importantes:

1. La presencia de anticuerpos anti-*H.pylori* IgA no son suficientes para diagnosticar infección por *Helicobacter pylori*. Otros estudios para for *Helicobacter pylori* (suministrados por Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l con código n° HPAG.CE, HPG.CE y HPM.CE), pueden ser realizados.
2. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. REALIZACIONES CARACTERÍSTICAS

La evaluación de las realizaciones deben ser dirigidas sobre paneles de muestras positivas y negativas en un laboratorio clínico externos con referencia a FDA.

1. Límite de detección

La comunidad Europea no ha definido estándares internacionales para la detección de anticuerpos anti-HP IgA. En su ausencia, un Internal Gold Standard (o IGS), derivado de pacientes con historia de infección por HP, ha sido definido con la finalidad de proporcionar un procedimiento con alta sensibilidad.

2. Especificidad y Sensibilidad Diagnósticas:

Las realizaciones diagnósticas fueron evaluadas en un centro externo de amplia experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La **sensibilidad diagnóstica** fue estudiada en un estudio externo en más de 50 muestras, pre-probadas como positivas con la referencia de kits de origen Europeo utilizados en los laboratorios. Muestras positivas fueron tomadas de pacientes con historial clínico de infección por *H. pylori*.

La especificidad diagnóstica fue determinada en un estudio externo en paneles de más de 100 muestras negativas de individuos normales y donantes de sangre, clasificados como negativos con la referencia del kit, incluidas las muestras potencialmente interferentes.

Tanto el plasma, derivado con diferentes técnicas de preparación estándar (citrato, EDTA y heparina) y los sueros se han utilizado para determinar la especificidad.

No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Además fueron estudiadas 35 muestras de reacciones cruzadas para verificar la ausencia de interferencias en el ensayo de los resultados. No se observó interferencia (100% de especificidad).

También se han analizado muestras congeladas, para verificar si las muestras congeladas interfieren con la realización de la prueba. No se observaron interferencias en el lavado y en las partículas de muestras gratuitas.

La Evaluación externa nos ofreció los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Reproducibilidad:

Un estudio realizado en tres muestras de diferentes anticuerpos anti-HP IgA reactividad, examinado en 16 replicaciones in 3 tiras separadas ha mostrado valores CV% entre 7-18% dependiendo de la lectura de la DO 450nm/620-630nm.

La variabilidad mostrada en las tablas no dió como resultado una clasificación errónea de las muestras.

S. LIMITACIONES

Falsos positivos han sido estudiados con menos del 2% de la población normal.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 54+9-555.
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.
9. 5, 817-823.

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni
(Milán) – Italia



