

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Helicobacter pylori IgM ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgM antibodies against Helicobacter pylori in serum and plasma



DEHEL03



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO

1. INTENDED USE	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS	4
5. REAGENTS PROVIDED	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	6
8. ASSAY PROCEDURE	6
9. EVALUATION	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA	13
11. LITERATUR	14
1. INTENSIÓN DE USO	15
2. INFORMACIÓN GENERAL	15
3. PRINCIPIO DEL ENSAYO	15
4. LIMITACIONES, PRECAUCIONES Y COMENTARIOS GENERALES	16
5. REACTIVOS PROVISTOS	16
6. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS	17
7. RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA	18
8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	18
9. EVALUACIÓN	19
10. CARACTERÍSTICAS DE ENSAYO	19
11. REFERENCIAS	20
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1. INTENDED USE

The Helicobacter pylori IgM Antibody ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgM antibodies against Helicobacter pylori in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC. Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Helicobacter pylori, a 2.5-3 µm long, twisted or helical gram-negative germ is responsible for 80-90% of B-gastritis cases and is suspected to be a major cofactor for the development of gastric and duodenal ulcers. Up to now Helicobacter pylori could be most reliably detected by culturing from mucous membrane biopsies; also a urease test was employed for identification. These detection methods are only successful for a relatively high germ count from the inoculate and require an identification directly after taking the biopsy. Recently it was shown that a detection of Helicobacter pylori by indirect immunofluorescence (IIF) should be superior to the above methods. The identification by IIF is also advantageous as it is not necessary to perform the determination directly after the biopsy; thus preparations can be sent to specialized laboratories. The colonisation of the gastric and duodenal mucous membranes by Helicobacter pylori can also be detected serologically by the performance of an enzyme immunoassay (ELISA) or by Western Blot. Patients with confirmed exposition to Helicobacter pylori often show a positive serological result. Since antibodies persist for a longer time after a Helicobacter pylori infection, seropositive individuals are also found among symptom-free patients. The ratio of seropositive values rises with age. By the determination of immunoglobulins in ELISA and by the detection of IgG, IgA and IgM antibodies against specific proteins of Helicobacter pylori in the Western Blot, it should be possible to diagnose an acute infection with Helicobacter pylori, even if no germs can be found. The detection of Helicobacter pylori is of remarkable interest for the therapy. Bismuth salts and antibiotics use to kill the germs, and these should complement or replace the usual therapy with antacidic and H₂ blocking agents. Serological monitoring could thus also be employed to control the success of anti-microbial therapy.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Helicobacter pylori IgM antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Helicobacter antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgM antibodies of the serum and the immobilized Helicobacter antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgM peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgM antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Symbol	Components	Volume / Qty.
SORB MT	Helicobacter pylori antigen coated microtiter strips	12
CAL A	Calibrator A (Negative Control)	2 mL
CAL B	Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL C	Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
CAL D	Calibrator D (Positive Control)	2 mL
ENZ CONJ	Enzyme Conjugate	15 mL
SUB TMB	Substrate	15 mL
STOP SOLN	Stop Solution	15 mL
SAM DIL	Sample Diluent	60 mL
WASH SOLN 10x	Washing Buffer (10x)	60 mL

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Microtiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with purified natural Helicobacter pylori antigen. Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgM antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01% methylisothiazolone and 0.01% bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgM antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgM antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgM antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01% methylisothiazolone and 0.01% bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgM-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L Proclin™. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)
- Plastic Bag

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.017	
Negative Control	0.019	0.002
Cut-Off Standard	0.555	0.538
Weak Positive Control	0.939	0.922
Positive Control	1.802	1.785

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run. The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Helicobacter pylori IgM antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet. For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen. Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline. For doubtful IgM positive results and for the confirmation of positive reactions the absorption of Rheumatoid Factor should be conducted with an appropriate reagent (Cat. No. DEMJS02, RF-Adsorbent).

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Helicobacter pylori ELISA	IgM
Intra-Assay-Precision	8.1 %
Inter-Assay-Precision	11.3 %
Inter-Lot-Precision	4.4 – 12.7 %
Analytical Sensitivity	1.03 U/mL
Recovery	88 – 107 %
Linearity	84 – 122 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Yersinia enterocolitica
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL und triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	99 %
Clinical Sensitivity	85 %

11. REFERENCES

1. Cover TL et al. Serologic detection of infection with cagA+ Helicobacter pylori strains. J. Clin. Microbiol., **33**: 1496 (1995).
2. Cutler AF et al. Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection. Gastroenterology, **109**: 136 (1966).
3. Dhar R et al. Evaluation and comparison of two immunodiagnostic assays for Helicobacter pylori antibodies with culture results. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **30**: 1 (1998).
4. Dixon MF. Helicobacter pylori and peptic ulceration; J. Gastroenterol. Hepatol., **6**: 125 (1991).
5. Donati M et al. Detection of serum antibodies to CagA and VacA and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with Helicobacter pylori-induced gastritis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., **4**: 478 (1997).
6. Evans DJ et al. A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection. Gastroenterology, **96**: 1004 (1989).
7. Gosciniak G. IgM and IgG antibodies in Helicobacter pylori infections. Zentralbl. Bakteriol., **286**: 494 (1997).
8. Heikkinen M et al. Usefulness of anti-Helicobacter pylori and anti-CagA antibodies in the selection of patients for gastroscopy. Am. J. Gastroenterol., **92**: 2225 (1997).
9. Karvar S et al. Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of Helicobacter pylori infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. J. Clin. Microbiol., **35**: 3058 (1997).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Helicobacter pylori IgM ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgM-Antikörpern gegen Helicobacter im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden. Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Helicobacter pylori, ein gramnegatives, spiralförmiges Bakterium mit Flagellen, das die Mukosa des Magens und des Dünndarms besiedelt, wurde 1984 von Warren und Marshall entdeckt. Seitdem weiß man, daß H. pylori ein primärer Verursacher bei der Entwicklung von Magen- und Dünndarm-Ulzera, chronisch-aktiver Gastritis, primärem gastrischen B-Zell-Lymphom sowie Adenokarzinom des Magens ist. Beim Dünndarmulkus wurde eine Infektionsrate von 93 % und beim Magenulkus von 80 % gefunden. Die Behandlung der Patienten mit Kombinationen von H₂-Blockern, Wismut und Antibiotika führte zu Heilungsraten von bis zu 90 %. Wenn die H. pylori Infektion erfolgreich behandelt ist, liegt die Häufigkeit einer Reinfektion bei unter 0,5 % / Jahr. Im Jahre 1994 stellte die NIH Consensus Conference fest, daß H. pylori einen peptischem Ulkus auslöst, und empfiehlt eine antimikrobielle Therapie. Es gibt eine Reihe von anerkannten Methoden zur Diagnose von H. pylori Infektionen. Bis vor kurzem war die Methode der Wahl die Endoskopie und Biopsie gekoppelt mit einem schnellen Ureasetest sowie Kulturanzüchtung und Histologie. Diese Methoden erfordern jedoch spezielle Geräte und sind personalintensiv. Da man erkannte, dass die H. pylori Infektion mit einer systemischen Immunantwort verbunden ist, wurden als preiswerte Alternative Enzymimmunoassays sowie als Bestätigungstests Western-Blot Verfahren zum Nachweis von IgG, IgA und IgM Antikörpern gegen den Erreger entwickelt. Gegenüber der KBR sowie Latex-Agglutinationsmethoden lassen sich einzelne Immunglobulinklassen differenzieren, wodurch Aussagen über das Stadium der Erkrankung möglich sind. Die Spezifität und die Sensitivität der Tests konnte durch Verwendung von gereinigten Antigenen unter Einschluss der hochmolekularen CagA und VacA Proteine verbessert werden. Der Vorteil der ELISA Methode beruht auf der Möglichkeit, die verschiedenen Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM getrennt nachzuweisen, womit eine eindeutige Zuordnung zu einer frischen oder einer abgelaufenen Infektion möglich wird.

3. TESTPRINZIP

Der Helicobacter IgM Antikörpertest basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Helicobacter pylori-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgM-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Helicobacter-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgM-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgM-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Symbol	Komponenten	Volumen / Menge
SORB MT	Helicobacter-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
CAL A	Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
CAL B	Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL C	Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
CAL D	Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
ENZ CONJ	Anti-human-IgM-Enzymkonjugat	15 mL
SUB TMB	Substratlösung	15 mL
STOP SOLN	Stopp-Lösung	15 mL
SAM DIL	Probenverdünner	60 mL
WASH SOLN 10x	Waschpuffer (10×)	60 mL

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Helicobacter-Antigen. Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon u. 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgG-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgG-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l Proclin™. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendekel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)
- Plastikbeutel

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,017	
Negativ-Kontrolle	0,019	0,002
Cut-Off Standard	0,555	0,538
schwach Positiv-Kontrolle	0,939	0,922
Positiv-Kontrolle	1,802	1,795

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden. Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Helicobacter IgM Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben. Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden. Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet. Bei fraglich IgM positiven Ergebnissen bzw. zur Absicherung einer positiven Reaktion sollte eine Rheumafaktor-Absorption mit einem geeigneten Reagenz (Best.-Nr. DEMJS02, RF-Adsorbent) vorgenommen werden.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Helicobacter pylori ELISA	IgM
Intra-Assay-Präzision	8,1 %
Inter-Assay-Präzision	11,3 %
Inter-Lot-Präzision	4,4 – 12,7 %
Analytische Sensitivität	1,03 U/mL
Wiederfindung	88 – 107 %
Linearität	84 – 122 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen Yersinia enterocolitis
Interferenzen	Keine Interferenz mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	99 %
Klinische Sensitivität	85 %

11. LITERATUR

1. Cutler, A.F. et al.: Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection; Gastroenterology 109, 136 (1966).
2. Dixon, M.F.: Helicobacter pylori and peptic ulceration; J. Gastroenterol. Hepatol. 6, 125 (1991).
3. Evans, D.J. et al.: A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection; Gastroenterology 96, 1004 (1989).
4. Marshall, B.J. et al.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulcer; Lancet 325, 1311 (1984).
5. Meijer, B.C. et al.: Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against Helicobacter pylori; J Clin Microbiol 35, 292 (1997).
6. Newell, D.G. et al.: An enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Campylobacter pylori-associated gastritis; Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 142, 53 (1988).
7. Rechcinski, T. et al.: Serological indicators of Helicobacter pylori infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors; Microbiol Immunol 41, 387 (1997).

1. INTENSIÓN DE USO

El Kit de ELISA de anticuerpos IgM anti Helicobacter pylori se ha diseñado para la detección y la determinación cuantitativa de anticuerpos específicos IgM contra Helicobacter pylori en suero y plasma. Otras aplicaciones en otros fluidos corporales son posibles y pueden solicitarse a DEMEDITEC. Los resultados de laboratorio no pueden ser la única base de un informe médico. La historia del paciente y otras pruebas, además, deben tenerse en cuenta.

2. INFORMACIÓN GENERAL

Helicobacter pylori, es un germen gram-negativo de una forma larga, retorcida o helicoidal, de 2,5-3 micras. Es responsable de un 80-90% de los casos de gastritis y se sospecha que es un cofactor importante para el desarrollo de las úlceras gástricas y duodenales. Hasta ahora Helicobacter pylori se pudo detectar más fiable mediante el cultivo a partir de biopsias de la membrana mucosa; También se empleó una prueba de ureasa para su identificación. Estos métodos de detección sólo tienen éxito para un relativamente alto número de gérmenes o inóculo y requieren una identificación directa después de tomar la biopsia. Recientemente se demostró que una detección de Helicobacter pylori mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF) debe ser superior a los métodos anteriores. La identificación por IIF también es ventajosa ya que no es necesario realizar la determinación directamente después de la biopsia; de este modo los preparados pueden ser enviados a laboratorios especializados. La colonización de las membranas mucosas gástricas y duodenales por Helicobacter pylori también pueden ser detectados serológicamente por el desempeño de un inmunoensayo enzimático (ELISA) o por Western blot. Los pacientes con exposición confirmada a Helicobacter pylori a menudo muestran un resultado serológico positivo. Dado que los anticuerpos persisten durante más tiempo después de una infección por Helicobacter pylori, individuos seropositivos se encuentran también entre los pacientes sin síntomas. La relación de los valores seropositivos aumenta con la edad. Por la determinación de inmunoglobulinas en ELISA y por la detección de anticuerpos IgG, IgA e IgM contra proteínas específicas de Helicobacter pylori en el Western blot, debería ser posible diagnosticar una infección aguda con Helicobacter pylori, incluso si no se pueden encontrar los gérmenes. La detección de Helicobacter pylori es de notable interés para la terapia. Sales y antibióticos de bismuto se utilizan para matar a los gérmenes, y éstas deberán complementar o reemplazar la terapia habitual con agentes bloqueantes y H2. El seguimiento serológico podría por tanto, también ser empleado para controlar el éxito de la terapia anti-microbiana.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit de prueba de anticuerpos IgM Helicobacter pylori se basa en el principio del inmunoensayo enzimático (EIA). El antígeno de Helicobacter está unido en la superficie de las tiras de microtitulación. El suero del paciente diluido o estándares listos para usar se pipetea en los pocillos de la microplaca. Una unión entre los anticuerpos IgM del suero y el antígeno de Helicobacter inmovilizado tiene lugar. Después de una incubación una hora a temperatura ambiente, la placa se enjuaga con solución de lavado diluida, con el fin de eliminar el material no unido. A continuación se añade listo para el uso el conjugado de peroxidasa anti-humana-IgM y se incuba durante 30 minutos. Después de una etapa de lavado adicional, el sustrato (TMB) se pipetea y se incuba durante 20 minutos, induciendo el desarrollo de un colorante azul en los pocillos. El desarrollo de color se terminó mediante la adición de una solución de parada, que cambia el color de azul a amarillo. El colorante resultante se mide espectrofotométricamente en una longitud de onda de 450 nm. La concentración de los anticuerpos IgM es directamente proporcional a la intensidad del color.

4. LIMITACIONES, PRECAUCIONES Y COMENTARIOS GENERALES

- Sólo para uso in vitro. No ingerir. Las precauciones de seguridad habituales de laboratorio, así como la prohibición de comer, beber o fumar en el laboratorio tienen que ser seguidas.
- Todos los sueros y plasma, han sido probados respectiva para HBsAg, VIH y VHC con métodos reconocidos y encontrados negativos. No obstante precauciones como el uso de guantes de látex tienen que ser tomadas.
- Suero y derrames de reactivos deben ser limpiados con una solución desinfectante (por ejemplo, hipoclorito de sodio, 5%) y tienen que ser eliminados adecuadamente.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18 a 25 ° C) antes de realizar la prueba.
- Antes de pipetear los reactivos se deben mezclar a fondo por inclinación suave o movimientos de balanceo. La agitación vigorosa con la formación de espuma se debe evitar.
- Es importante pipetear con intervalos constantes, de modo que todos los pocillos de la placa de microtitulación tengan las mismas condiciones.
- Al extraer los reactivos fuera de las botellas, se debe tener la precaución de evitar que los tapones no se contaminen. Además de evitar una posible confusión. El contenido de las botellas es generalmente sensible a la oxidación, por lo que deben ser abiertas sólo por un corto tiempo.
- Con el fin de evitar un traspaso o una contaminación cruzada, puntas de pipeta desechable separadas tienen que ser utilizados.
- Todos los reactivos tienen que ser utilizados dentro del período de expiración.
- De acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) o de ISO9001 todos los dispositivos de laboratorio deben ser controlados periódicamente en cuanto a la exactitud y precisión. Esto se refiere, entre otros, a micropipetas e instrumentación de lavado o lectura (ELISA-Lector).
- El contacto de ciertos reactivos, sobre todo la solución de parada y el sustrato, con la piel, los ojos y la mucosa se debe evitar, ya que podrían surgir posibles irritaciones y quemaduras de ácido, y existe el peligro de intoxicación.

5. REACTIVOS PROVISTOS

Simbolo	Componentes	Volumen / Qty.
SORB MT	Tiras de micropozos cubiertas con antígeno de Helicobacter pylori	12
CAL A	Calibrador A (Control Negativo)	2 mL
CAL B	Calibrador B (Cut-Off Estandar)	2 mL
CAL C	Calibrador C (Control Positivo Débil)	2 mL
CAL D	Calibrador D (Control Positivo)	2 mL
ENZ CONJ	Conjugado Enzimático	15 mL
SUB TMB	Sustrato	15 mL
STOP SOLN	Solución de Parada	15 mL
SAM DIL	Diluyente de Muestra	60 mL
WASH SOLN 10x	Buffer de Lavado (10x)	60 mL

Almacenamiento y Estabilidad (consulte la fecha de caducidad en la etiqueta externa de la caja) Almacenar los componentes del kit a 2-8°C y no utilizar después de la fecha de caducidad en la etiqueta exterior caja. Antes de su uso, todos los componentes deben dejarse reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente (18-25°C). Después de su uso, la placa debe volver a cerrarse y el kit almacenado a 2-8°C. Después de la primera apertura del kit se debe utilizar dentro de los 3 meses, el tampón de lavado diluido se puede mantener durante 4 semanas a 2 y 8°C.

5.1. Tiras con Micropozos

12 tiras con 8 pocillos separables cada una, recubiertas con antígeno de Helicobacter pylori naturales y purificada. Listo para usar.

5.2. Calibrador A (Control Negativo)

2 ml, solución de proteína diluida con PBS, no contiene anticuerpos IgM contra Helicobacter. La adición de 0,01% methylisothiazolone y 0,01% bromonitrodioxane. Listo para usar.

5.3. Calibrador B (Cut-Off Estandar)

2 ml de suero humano se diluyó con PBS, contiene una baja concentración de anticuerpos IgM contra Helico-bacter. La adición de 0,01% metilisotiazolona y 0,01% de bromonitrodioxane. Listo para usar.

5.4. Calibrador C (Control Positivo Débil)

2 ml de suero humano se diluyó con PBS, contiene una concentración media de anticuerpos IgM contra Helicobacter. La adición de 0,01% metilisotiazolona y 0,01% de bromonitrodioxane. Listo para usar.

5.5. Calibrador D (Control Positivo)

2 ml de suero humano se diluyó con PBS, contiene una alta concentración de anticuerpos IgM contra Helico-bacter. La adición de 0,01% metilisotiazolona y 0,01% de bromonitrodioxane. Listo para usar.

5.6. Conjugado Enzimático

15 ml, anti-humana-IgM-HRP (conejo), en una solución tampón que contiene proteína. La adición de 0,01% methyli-sothiazolona y 0,01% bromonitrodioxane y 5 mg/l ProClin™. Listo para usar.

5.7. Sustrato

15 ml, TMB (tetrametilbenzidina). Listo para usar.

5.8. Solución de Parada

15 ml, solución ácida 1 N. Listo para usar.

5.9. Diluyente de Muestra

60 ml de tampón, PBS / BSA. La adición de 0,095% de azida de sodio. Listo para usar.

5.10. Buffer de Lavado

60 ml, PBS + Tween 20, 10x concentrado. La concentración final: diluir 1 + 9 con agua desionizada. Si durante el almacenamiento en frío precipitan cristales, el concentrado debe ser calentado a 37°C durante 15 minutos.

6. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

- Pipetas de 5 µL-, 100 µL- y 500 y multicanal
- Lector de placa de microtitulación (450 nm)
- Lavador de Microplaca.
- Tubos de reactivos para la dilución de suero.
- Agua desionizada.
- Tapa negra reutilizable para cubrir (Disponible bajo petición en Demeditec Diagnostics GmbH).
- Bolsa Plástica

7. RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA

Principalmente suero o plasma (EDTA, heparina) puede ser utilizado para la determinación. La sangre se extrae asépticamente por punción venosa, el suero se separa después de la coagulación y centrifugación y las muestras de suero o plasma pueden almacenarse refrigeradas (2-8°C) durante un máximo de 7 días. Para un almacenamiento más prolongado que deben mantenerse a -20°C. Las muestras no deben ser congeladas y descongeladas repetidamente. Las muestras lipémicas, hemolizadas o contaminadas con bacterias pueden causar resultados negativos falsos o positivos falsos. Para la realización de la prueba de las muestras (no los estándares) deben ser diluidas 1: 101 con el diluyente de muestra (por ejemplo, 5 µl de suero + 500 µl diluyente de muestra).

8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

8.1. Preparación de los reactivos

Solución de lavado: diluir antes de usar 1 + 9 con agua desionizada. Si durante el almacenamiento en frío precipitan cristales, el concentrado debe ser calentado a 37°C durante 15 minutos.

- La adhesión estricta al protocolo se recomienda para un rendimiento fiable. Cualquier cambio o modificación son responsabilidad del usuario.
- Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente antes de su uso, pero no se debe dejar a esta temperatura más tiempo del necesario.
- Una curva estándar debe establecerse con cada ensayo.
- Devolver las tiras de microtitulación no usadas a la bolsa de plástico y almacenarlos en seco a 2-8°C.

8.2. Pasos del Ensayo

1. Preparar una cantidad suficiente de pocillos de microtitulación para los estándares, controles y muestras, así como para un espacio para el blanco de sustrato.
2. Pipetear 100 µl cada uno de las muestras diluidas (1:101), los estándares y controles listos para el uso respectivamente en los pocillos. Dejar un pozo vacío para el blanco del sustrato.
3. Cubra la placa e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
4. Vaciar los pocillos de la placa (volcado o aspirado) y añadir 300 µl de solución de lavado diluida. Este procedimiento se repite tres veces totalmente. Restos de tampón de lavado se quitan después golpeando ligeramente las placas sobre papel absorbente.
5. Pipetear 100 µl de conjugado listo para usar en cada uno de los pocillos. Dejar un pozo vacío para el blanco del sustrato.
6. Cubra la placa con la cubierta de la placa reutilizable e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Vaciar los pocillos de la placa (volcado o aspirado) y añadir 300 µl de solución de lavado diluida. Este procedimiento se repite tres veces. Restos de tampón de lavado se quitan después golpeando ligeramente las placas de microtitulación sobre papel absorbente.
8. Pipetear 100 µl del sustrato listo para su uso en cada uno de los pocillos. Esta vez también el blanco del sustrato se pipeta.

9. EVALUACIÓN

Ejemplo

	Valor de DO	DO Corregida
Blanco de Sustrato	0.017	
Control Negativo	0.019	0.002
Cut-Off Estandar	0.555	0.538
Control Positivo Débil	0.939	0.922
Control Positivo	1.802	1.785

La tabla anterior contiene sólo un ejemplo, que se logró bajo temperatura y condiciones ambientales arbitrarias. Los datos descritos no son valores de referencia que se deben encontrar en otros laboratorios de la misma manera.

9.1. Evaluación Cualitativa

Las absorbancias calculadas para los sueros de los pacientes, como se mencionó anteriormente, se comparan con el valor para el estándar de corte. Si el valor de la muestra es mayor, se obtiene un resultado positivo. Para un valor por debajo del nivel de corte, hay un resultado negativo. Parece razonable definir un rango de +/- 20% en torno al valor de la línea de corte como una zona gris. En tal caso, se recomienda la repetición de la prueba con el mismo suero o con una nueva muestra del mismo paciente, tomada después de 2-4 semanas. Ambas muestras se deben medir en paralelo en el mismo plazo. El control positivo debe mostrar al menos, el doble de la absorción en comparación con el estándar de corte.

9.2. Evaluación Cuantitativa

Los estándares y los controles del kit Helicobacter pylori IgM-listos para usar se definen y se expresan en unidades arbitrarias (U / ml). Esto se traduce en una evaluación cuantitativa exacta y reproducible. Consecuentemente para un paciente dado los controles de seguimiento se hacen posibles. Los valores de los controles y estándares y las unidades se imprimen en la hoja de datos del control de calidad. Para una evaluación cuantitativa de las absorbancias de los estándares y los controles se dibujan gráficamente de punto a punto en contra de sus concentraciones. A continuación, a partir de la curva de referencia resultante los valores de concentración para cada muestra de paciente, se pueden extraer en relación con sus absorbancias. También es posible utilizar programas de ordenador automáticas. Como ajuste de curva tiene que ser elegido de punto a punto. Calibrador B con su concentración de 10 U / ml sirve como estándar de corte. Análoga a la evaluación cualitativa se define como una zona gris un rango de +/- 20% en torno a la línea de corte. Por lo tanto los resultados entre 8 y 12 U / ml son reportados como límite. Para los resultados positivos dudosos IgM y para la confirmación de reacciones positivas a la absorción del Factor reumatoide debe llevarse a cabo con un reactivo apropiado (Cat. No. DEMJS02, RF-adsorbente).


10. CARACTERÍSTICAS DE ENSAYO

Helicobacter pylori ELISA	IgM
Precision Intra-Ensayo	8.1 %
Precision Inter-Ensayo	11.3 %
Precision Inter-Lote	4.4 – 12.7 %
Sensibilidad analítica	1.03 U/mL
Recuperación	88 – 107 %
Linealidad	84 – 122 %
Reacción Cruzada	No reactividad cruzada con Yersinia enterocolitica
Interferencias	No hay interferencias con bilirrubina hasta 0,3 mg / ml, hemoglobina hasta 8,0 mg / ml y triglicéridos hasta 5,0 mg / ml
Especificidad Clínica	99 %
Sensibilidad Clínica	85 %

11. REFERENCIAS

1. Cover TL et al. Serologic detection of infection with cagA+ Helicobacter pylori strains. J. Clin. Microbiol., **33**: 1496 (1995).
2. Cutler AF et al. Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection. Gastroenterology, **109**: 136 (1966).
3. Dhar R et al. Evaluation and comparison of two immunodiagnostic assays for Helicobacter pylori antibodies with culture results. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **30**: 1 (1998).
4. Dixon MF. Helicobacter pylori and peptic ulceration; J. Gastroenterol. Hepatol., **6**: 125 (1991).
5. Donati M et al. Detection of serum antibodies to CagA and VacA and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with Helicobacter pylori-induced gastritis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., **4**: 478 (1997).
6. Evans DJ et al. A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection. Gastroenterology, **96**: 1004 (1989).
7. Gosciniak G. IgM and IgG antibodies in Helicobacter pylori infections. Zentralbl. Bakteriol., **286**: 494 (1997).
8. Heikkinen M et al. Usefulness of anti-Helicobacter pylori and anti-CagA antibodies in the selection of patients for gastroscopy. Am. J. Gastroenterol., **92**: 2225 (1997).
9. Karvar S et al. Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of Helicobacter pylori infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. J. Clin. Microbiol., **35**: 3058 (1997).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore