

Helori CTX IgG

Test immunoenzimatico in colorimetria per la determinazione degli anticorpi IgG specifici anti CagA (*Helicobacter pylori*) nel siero umano.

Per uso diagnostico in vitro.

Campo di applicazione

Helori-CTX IgG viene usato per la determinazione degli anticorpi IgG diretti contro la proteina associata alla citotossina (CagA) di *Helicobacter pylori* nel siero umano, che rivestono importanza clinica nelle patologie gastriche. Helori-CTX IgG rappresenta un valido supporto per la diagnosi di patologia gastrica in associazione alle informazioni cliniche essendo stato dimostrato il legame tra infezione da *Helicobacter pylori* e sviluppo di ulcere. Recenti studi, inoltre, dimostrano che ceppi H.p. che esprimono la citotossina sono più patogeni di quelli che ne sono privi.

Materiali forniti

Fase solida	12x8 pozzetti
Coniugato (IgG, capra) (2000x)	1x300 µl
Substrato	1x14 ml
Controllo positivo (umano)	1x1,5 ml
Controllo negativo (umano)	1x1,5 ml
Calibratore (umano)	1x1,5 ml
Diluyente campione/coniugato (10x)	1x30 ml
Soluzione di lavaggio (20x)	1x50 ml
Soluzione di arresto	1x15 ml

Composizione dei materiali/reagenti forniti

1. Fase solida

12 strip da 8 pozzetti cadauna con antigene adsorbito, in un sacchetto di plastica contenente un dessiccante.

2. Coniugato (IgG)

Un flacone contenente 300 µl di anticorpi di capra anti-IgG umane concentrati 2000x, marcati con perossidasi, in soluzione tamponata con aggiunta di conservante.

3. Substrato

Un flacone contenente 14 ml di una soluzione di TMB tamponata con aggiunta di conservante.

4. Controllo positivo

Un flacone contenente 1,5 ml di siero di controllo positivo (umano) in soluzione tamponata con aggiunta di conservante.

5. Controllo negativo

Un flacone contenente 1,5 ml di siero di controllo negativo (umano) in soluzione tamponata con aggiunta di conservante.

6. Calibratore

Un flacone contenente 1,5 ml di siero positivo (umano) in soluzione tamponata con aggiunta di conservante. Il valore in Unità del Calibratore è riportato in etichetta

7. Diluyente del campione/coniugato

Un flacone contenente 30 ml di una soluzione concentrata 10x tamponata con aggiunta di conservante.

8. Soluzione di lavaggio

Un flacone contenente 50 ml di una soluzione concentrata 20x con detergente e conservante.

9. Soluzione di arresto

Un flacone contenente 15 ml di una soluzione contenente H₂SO₄ 1N

Strumenti e materiali richiesti ma non forniti

1. Lettore colorimetrico a 450 nm
2. Pipette di precisione da 10, 20, 100 e 1000 µl
3. Incubatore 37° C
4. Acqua distillata

Principio del metodo

Helori-CTX IgG è un dosaggio immunoenzimatico sandwich. L'antigene è legato ai pozzetti per microtitolazione. Gli anticorpi specifici per tale antigene presenti nel siero del paziente si legano all'antigene stesso. Gli anticorpi non specifici vengono allontanati mediante lavaggio. Si aggiungono quindi anticorpi di capra anti-IgG umane marcati con perossidasi che si legano agli anticorpi rimasti adesi al fondo del pozzetto. Il coniugato in eccesso viene allontanato per lavaggio; si aggiunge poi un substrato cromogeno. Dopo un'ulteriore incubazione, si misura il valore di densità ottica con apposito colorimetro. Maggiore è la densità

ottica, maggiore è la concentrazione delle IgG specifiche presenti nel campione.

Criteri di prestazione e limiti del metodo

1. Variazioni intra saggio

Quattro sieri sono stati testati per 4 volte. I risultati sono di seguito riportati:

Siero	1	2	3	4
Val. medio (D.O.)	0,144	0,253	0,488	1,005
C.V.%	10,1	3,9	4,3	2,6

2. Variazioni inter-saggio

Tre diversi sieri sono stati testati in doppio in tre differenti sedute. I risultati sono di seguito riportati:

Siero	1	2	3
Val. medio (Unità)	7,9	14,8	31,8
C.V.%	7,2	9,3	6,5

Sensibilità e specificità

Sensibilità: 94,1%

Specificità: 97,9%

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio

Diluire il flacone fornito con acqua distillata fino ad ottenere un volume pari a 1000 ml.

Diluyente del campione/coniugato

Diluire 1:10 con acqua distillata.

Coniugato

Diluire 1: 2000 con diluyente del campione/coniugato. Preparare dapprima una diluizione 1:50 (20 µl coniugato concentrato + 980 µl di diluyente del campione / coniugato). Da questa diluizione (1:50) prelevare 300 µl da aggiungere a 12 ml di diluyente del campione/coniugato. La stabilità del coniugato diluito è di 12 ore.

Conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2-8°C ed usati prima della data di scadenza stampata sulla loro etichetta.

Raccolta campioni

Helori CTX IgG richiede l'utilizzo di siero. È importante conservare l'integrità chimica del campione di sangue dal momento del prelievo fino all'esecuzione del test. Eseguire il prelievo usando una tecnica non traumatica. Lasciare coagulare il sangue per almeno 20-30 minuti in modo

da facilitare la retrazione del coagulo. Prima di centrifugare staccare il coagulo dalle pareti della provetta. Non è necessario aggiungere conservanti al campione di siero per mantenerne l'integrità. I campioni devono essere conservati a 2-8°C ed analizzati entro 24 ore dal prelievo. Se l'analisi non può essere eseguita entro 24 ore, congelare il campione di siero. Evitare di congelare e scongelare più volte (aliquotare). I campioni prima di essere utilizzati devono essere diluiti 1:100 (10 µl di siero in 0,990 ml di diluente del campione). La diluizione così ottenuta può essere conservata per 24 ore a 4° C o una settimana a -20° C.

Procedimento

Stabilire la quantità di siero dei pazienti necessaria al completamento dei saggi. Preparare i campioni diluendo ciascun siero 1:100 (10 µl di siero in 0,990 ml di diluente del campione) e mescolando bene. Il calibratore ed i controlli positivo e negativo non vanno diluiti in quanto già forniti a concentrazione di lavoro.

1. Pipettare 100 µl di diluente del campione/ coniugato nei pozzetti A1 e B1.
2. Pipettare 100 µl di calibratore nei pozzetti C1 e D1.
3. Pipettare 100 µl di controllo positivo, di controllo negativo e dei campioni diluiti nei restanti pozzetti.
4. Coprire la piastra per evitare l'evaporazione ed incubare 60 minuti a 37°C.
5. Alla fine dell'incubazione rovesciare i pozzetti e dare un colpo secco per eliminare tutto il liquido.
6. Lavare 3 volte i pozzetti con soluzione di lavaggio.
7. Rovesciare ed agitare il supporto per eliminare il liquido.
8. Pipettare 100 µl di coniugato anti-IgG diluito in tutti i pozzetti.
9. Incubare i pozzetti coperti per 60 minuti a 37°C.
10. Ripetere i lavaggi come sopra.
11. Pipettare in ciascun pozzetto 100 µl di substrato.
12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio.
13. Bloccare la reazione dispensando nei pozzetti 100 µl di soluzione di arresto. Il colore della soluzione cambierà da blu a giallo.
14. Leggere al colorimetro a 450 nm.

Calcolo dei risultati analitici

Determinare i valori D.O. per il bianco, i campioni ed i controlli. I valori vanno confrontati con il valore medio del calibratore. Sottrarre la D.O. del bianco a tutti i valori in D.O. ottenuti. Il metodo di espressione dei risultati fa uso di Unità ottenibili dalla seguente formula:

$$\text{Unità} = \frac{\text{(D.O. Campione)} \times \text{Valore Unità Calibratore}}{\text{(D.O. Calibratore)}}$$

Il valore in D.O. del Calibratore deve essere > 0,600.

Il valore in Unità del Calibratore è riportato in etichetta. È importante non scambiare calibratori di lotti diversi.

Controllo di Qualità

La D.O. del controllo negativo dovrebbe essere sempre < di 0,100.

La D.O. del controllo positivo dovrebbe essere sempre > di 0,800.

Intervallo di riferimento

Come buona norma, ogni laboratorio deve calcolare i propri valori di normalità. Per tale calcolo utilizzare un numero statisticamente significativo di sieri di soggetti senza alcuna evidenza di presente o passata patologia connessa con infezione da *Helicobacter pylori*. Determinare la media e la deviazione standard dei valori espressi come indice percentuale di tali sieri. Considerare positivi i titoli superiori alla media più 3 dev. standard della popolazione sana di riferimento; negativi sono i titoli inferiori alla media più 2 dev. standard. I valori compresi tra la media più 2 e 3 dev. standard sono da considerarsi dubbi e necessitano di una ulteriore indagine. Tramite l'analisi preliminare di una popolazione italiana si sono ottenuti i valori seguenti:

Negativo	< 5 Unità
Borderline	5 - 7,5 Unità
Positivo	> 7,5 Unità

Questi valori sono indicativi e non devono sostituire la normale procedura di laboratorio.

Precauzioni

1. Il conservante presente nei reagenti è Thimerosal a concentrazione inferiore a 0,05% (p/p). Evitare il contatto prolungato e ripetuto.

La soluzione d'arresto può causare

irritazione della pelle, degli occhi e delle vie respiratorie nei soggetti sensibili. Manipolare utilizzando guanti adatti.

2. Attendere che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima di iniziare il test.
3. I sieri usati per i controlli di questo kit sono risultati negativi all'analisi per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg), per il virus dell'epatite C (HCV) e per il virus HIV tipo I e II. Tuttavia è consigliabile manipolarli come se si trattasse di materiale potenzialmente infettante.
4. È molto importante non scambiare i componenti di lotti diversi.

Bibliografia

1. Vaira D, Holton J, Miglioli M, et al. Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. *Current opinion in Gastroenterology* 1994; 10: 98-104.
2. Vaira D, Miglioli M, Mulè P, et al. Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. *Gut* 1994; 35: 309-12.
3. Figura N, Bugnoli M, Cusi MG, et al. Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*: production of cytotoxin. In: Malfertheiner P, Ditschuneil H (ed): *Helicobacter pylori, gastritis and peptic ulcer*: Springer, Berlin, 1990, p.86-95
4. Weel JF, Van der Hulst RW, Gerrits Y, et al. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis*, 173:5, 1996 May, 1171-5

Helori CTX IgG

96 determinazioni, codice 8723

Data di preparazione

31.10.2004

Prodotto da:
ravo Diagnostika GmbH
Oltmannstr. 5
79100 Freiburg
Germany



Distribuito da:

Eurospital
Eurospital SpA
34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39-040-8997-1 Fax +39-040-280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com

Helori CTX IgG

Enzyme immunoassay for the determination of IgG antibodies against CagA (Helicobacter pylori) in human serum.
For in vitro diagnostic use only

Application field

Helori-CTX is used for the determination of IgG antibodies directed against the cytotoxin associated protein (CagA) of Helicobacter pylori in the human serum. These antibodies have a relevant importance in the gastric pathologies. Helori CTX IgG represents a support to the clinical data for the diagnosis of this disease since the link between H.p. infection and ulcer development has been proved. Recent studies, moreover, show that H.p. strains expressing cytotoxic activity are more pathogen than those without the protein.

Materials provided with the kit

Solid phase	12x8 wells
Conjugate (IgG, goat antibody) (2000x)	1x300 µl
Substrate	1x14 ml
Positive control (human)	1x1.5 ml
Negative control (human)	1x1.5 ml
Calibrator	1x1.5 ml
Sample/conjugate diluent (10x)	1x30 ml
Washing solution (20x)	1x50 ml
Stop solution	1x15 ml

Composition of supplied reagents/materials

1. Solid phase

12 strips of 8 wells coated with purified antigen, in a plastic bag containing a desiccant.

2. Conjugate (IgG)

One vial containing 300 µl concentrate horse-radish peroxidase-labelled goat anti-human IgG antibodies (2000x) in a buffer solution with a preservative.

3. Substrate

One vial containing 14 ml TMB solution in a buffer solution with a preservative.

4. Positive control

One vial containing 1.5 ml positive control serum (human) with a preservative. Ready to use.

5. Negative control

One vial containing 1.5 ml negative control serum (human) with a preservative. Ready to use.

6. Calibrator

One vial containing 1.5 ml positive control serum (human) in a buffer solution with a preservative. The value of calibrator Units is printed on the vial label. Ready to use.

7. Sample/conjugate diluent

One vial containing 30 ml concentrated buffer (10x) solution with a preservative.

8. Washing solution

One vial containing 50 ml concentrate solution (20x) with detergent and preservative.

9. Stop solution

One vial containing 15 ml H₂SO₄ 1N.

Materials required but not provided

1. Microplate EIA reader (450 nm)
2. Precision pipettes (10, 20, 100, 1000 µl)
3. Incubator at 37°C.
4. Distilled water

Principle of the procedure

Helori CTX IgG is a sandwich type enzyme-immunoassay. The purified antigen is attached to microtitration wells. Antigen-specific antibodies in the patient's serum bind to the antigens. Non-specific antibodies are removed by washing.

Horse-radish peroxidase labelled goat-anti-human IgG are added and bind to human antibodies in the well. The excess conjugate is washed away; then a chromogenic substrate is added. After an appropriate incubation period, the Optical Density of the substrate is measured by means of a EIA reader. The higher the amount of specific antibodies present in the sample, the greater the O.D. values.

Performance criteria and limits of the procedure

1. Intra-assay

Four reference sera were tested 4 times.

The results are reported below:

Serum	1	2	3	4
Mean OD Value	0.144	0.253	0.488	1.005
C.V.%	10.1	3.9	4.3	2.6

2. Inter-assay variation

Three reference sera were tested in duplicate in three different runs. The results are reported below:

Serum	1	2	3
Mean Value (units)	7.9	14.8	31.8
C.V.%	7.2	9.3	6.5

Sensitivity and specificity

Sensitivity: 94.1%

Specificity: 97.9%

Preparation of reagents

Washing solution

Prepare the washing solution diluting the content of the whole vial with distilled water to a final volume of 1000 ml.

Sample/conjugate diluent

To be diluted 1:10 with distilled water.

Conjugate

Prepare the conjugate solution diluting 1:2000 with conjugate diluent. First dilute 1:50 (20 µl concentrated conjugate in 980 µl sample/conjugate diluent). Then transfer 300 µl (1:50 dilution) in 12 ml of sample/conjugate diluent. The diluted conjugate is stable for 24 hours.

Storage

All reagents must be stored at 2-8°C and used before the expiration date printed on the vial label.

Sample collection

Helori CTX IgG requires serum. It is important to preserve the integrity of the blood sample from its collection till the end of the test. Perform phlebotomy using a non-traumatic venipuncture technique. Allow blood to clot for at least 20-30 minutes, until the clot starts to retract. Before centrifugation, remove the clot from the collection tube walls. It is not necessary to add preservatives to the serum to keep integrity of the serum sample. Samples should be stored at 2-8°C and assayed

within 24 hours after collection. If the test cannot be run within 24 hours, serum sample should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of serum. Sample must be diluted 1:100 (10 µl serum in 0.99 ml sample diluent) before use. Diluted samples can be stored for 24 hours at 4°C or for a week at -20°C.

Procedure

Define the appropriate amount of patients sera needed to complete the test. Prepare the samples by diluting each serum 1:100 (10 µl serum in 0.99 ml sample diluent) and mix well. Calibrator, Positive and Negative controls provided with the kit are ready to use and are not to be diluted.

1. Pipette 100 µl sample/conjugate diluent into wells A1-B1.
2. Pipette 100 µl of calibrator into wells C1-D1.
3. Pipette 100 µl positive control, negative control and diluted samples into the remaining wells.
4. Cover the wells in order to prevent evaporation and incubate for 60 minutes at 37°C.
5. After incubation remove the liquid completely.
6. Wash 3 times using 200 µl/well of washing solution.
7. Remove the liquid as before.
8. Pipette 100 µl anti-IgG diluted conjugate in each well.
9. Incubate covered wells for 60 minutes at 37°C.
10. Repeat washing steps as above.
11. Pipette 100 µl chromogenic substrate in each well.
12. Incubate covered wells for 30 minutes at room temperature in the dark.
13. Stop the reaction by adding 100 µl stop solution. The colour of the reagent solution will turn from blue to yellow.
14. Read the results at 450 nm.

Calculation of results

Determine the average O.D. values of Blank, Controls and patients samples. Values must be compared with mean values of calibrator. Subtract the Blank O.D. (A1-B1) from all the obtained results. The concentration of each sample is expressed

as Units obtained from the following formula:

$$\text{Unit\`a} = \frac{\text{Sample O.D.} \times \text{Calibrator value (Units)}}{\text{Calibrator O.D.}}$$

O.D. value of Calibrator must be > 0.600. The value of calibrator Units is printed on the vial label. Do not use calibrators from different batches.

Quality control

O.D. of negative control must be always <0.100.

O.D. of positive control must be always >0.800.

Reference limits

Good laboratory practice indicates that each laboratory should establish its own range of normal values using a statistically significant number of samples without any clinical evidence of present or previous pathology connected with *Helicobacter pylori* infection. The negative range is usually indicated as Mean plus 2 Standard Deviations, while the lower limit of the positive is indicated by Mean plus 3 Standard Deviations. The range between 2 and 3 Standard Deviations refers to the borderline samples. The borderline values need further investigation and should re-tested. Therefore, each laboratory should establish its own cut-off value. Preliminary analysis of Italian samples provided with the following values:

Negative	< 5 Units
Borderline	5 - 7.5 Units
Positive	> 7.5 Units

The values reported above are just an indication and must not replace the routine method used in each laboratory.

Precautions

1. Concentration of Thymerosal used as preservative in the reagent solutions is lower than 0,05% (w/w). Avoid any unnecessary contact.

The stop solution may cause irritation of the skin, of the eyes and of the respiratory tract in sensitive individuals. Handle wearing suitable gloves.

2. Allow all the reagents to reach room temperature.

3. All sera used in this kit were found to be not reactive for Hepatitis B surface antigen (HBsAg), for anti-HCV and for anti-HIV 1-2. However, this material should be handled as potentially infectious.

4. Do not mix components from different boxes.

Bibliography

1. Vaira D, Holton J, Miglioli M, et al. Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. Current opinion in Gastroenterology 1994; 10: 98-104.
2. Vaira D, Miglioli M, Mulè P, et al. Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. Gut 1994; 35: 309-12.
3. Figura N, Bugnoli M, Cusi MG, et al. Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*: production of cytotoxin. In: Malfertheiner P, Ditschuneil H (ed): *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulcer: Springer, Berlin, 1990, p.86-95
4. Weel JF, Van der Hulst RW, Gerrits Y, et al. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. J Infect Dis, 173:5, 1996 May, 1171-5.

Helori CTX IgG

code 8723, 96 tests

Date of preparation

31.10.2004

Manufactured by:
ravo Diagnostika GmbH
Oltmannstr. 5
79100 Freiburg
Germany



Distributed by:

Eurospital

Eurospital SpA
34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39-040-8997.1 Fax +39-040-280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com

Helori CTX IgG

Este test inmunoenzimático está destinado a la detección de anticuerpos IgG contra CagA (*Helicobacter pylori*) en suero humano. Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.

Campo de aplicación

Helori-CTX se usa para la determinación de anticuerpos IgG producidos contra la proteína asociada a la citotoxina de *H. pylori* en el suero humano. Estos anticuerpos tienen una importancia notable en las patologías gástricas. Helori-CTX IgG supone una ayuda en la interpretación de los datos clínicos en el diagnóstico de esta enfermedad ya que existen evidencias probadas entre la infección por este microorganismo y el desarrollo de úlceras. Además, según demuestran unos estudios recientes, las cepas de *H. pylori* que presentan actividad citotóxica son más patógenas que aquellas que no muestran actividad por esta proteína.

Materiales suministrados con el kit

Fase sólida	12x8 pocillos
Conjugado (anticuerpos de cabra IgG) (2000x)	1x300 µl
Substrato	1x14 ml
Control positivo (humano)	1x1,5 ml
Control negativo (humano)	1x1,5 ml
Calibrador	1x1,5 ml
Diluyente de muestra/conjugado (10x)	1x30 ml
Solución de lavado (C20x)	1x50 ml
Solución de parada	1x15 ml

Composición de los reactivos y materiales suministrados

1. Fase sólida

12 tiras con 8 pocillos cada una recubiertos de antígeno purificado selladas en una bolsa de polietileno que contiene un desecante.

2. Conjugado IgG

Un vial que contiene 300µL de anticuerpos anti-IgG humana de origen animal (cabra), marcados con peroxidasa de rábano a una concentración de 2000x en una solución tamponada con un conservante.

3. Substrato

Un vial que contiene 14mL de la tetrarmetilbenzidina (TMB) en una solución tamponada con un conservante

4. Control positivo

Un vial que contiene 1,5mL de suero control positivo (humano) con un conservante. Listo para su uso.

5. Control negativo

Un vial que contiene 1,5mL de suero control negativo (humano) con un conservante. Listo para su uso.

6. Calibrador

Un vial que contiene 1,5mL de suero control positivo (humano) en una solución tamponada con un conservante. El valor específico del calibrador está impreso en la etiqueta del vial. Listo para su uso.

7. Diluyente de muestra/conjugado

Un vial que contiene 30mL de una solución tamponada y concentrada (20x) donde se ha añadido un conservante.

8. Solución de lavado

Un vial que contiene 50mL de una solución concentrada (20x) con detergente y un conservante.

9. Solución de parada

Un vial que contiene 15mL de H₂SO₄ 1N.

Materiales necesarios pero no suministrados

1. Lector de microplacas de longitud de onda dual o única con filtro de 450nm.
2. Micropipetas para manipular diversos volúmenes (10, 20, 100, 1000µL).
3. Incubador a 37°C
4. Agua destilada

Principio del ensayo

Helori CTX IgG es un test inmunoenzimático de tipo *sandwich*. Los antígenos purificados están unidos a los pocillos de microensayo de fase sólida. Cuando los antígenos adheridos a la fase sólida entran en contacto con el suero de un paciente, el anticuerpo específico frente al antígeno, si está presente, se unirá al antígeno de la fase sólida formando complejos antígeno-anticuerpo. El exceso de anticuerpos se retira mediante lavados. Posteriormente, se añaden anticuerpos IgG antihumanos de cabra conjugadas con peroxidasa de rábano, que se unen a los complejos antígeno-anticuerpo en los pocillos. El conjugado sobrante se retira mediante lavado, y a continuación, se añade el substrato cromógeno TMB. Si el suero del paciente presenta algún anticuerpo específico frente al antígeno, aparecerá un color azul. Al

interrumpir la reacción enzimática con H₂SO₄ 1N, el contenido del pocillo se volverá amarillo. El color, indicativo de la concentración de anticuerpos en el suero, se puede leer en un espectrofotómetro adecuado o en un lector de microplacas. Cuanto más grande sea la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra, mayor serán los valores de densidad óptica (DO).

Características de rendimiento y limitaciones de uso

1. Variaciones intra-ensayo

Cuatro sueros de referencia fueron analizados cuatro veces cada uno obteniendo los siguientes resultados:

Suero	1	2	3	4
Media del Val. de DO	0,144	0,253	0,488	1,005
C.V.%	10,1	3,9	4,3	2,6

2. Variaciones intra-ensayo

Tres sueros de referencia fueron analizados por duplicado en tres pruebas independientes obteniendo los siguientes resultados:

Suero	1	2	3
Media del Val. (Unidades)	7,9	14,8	31,8
C.V.%	7,2	9,3	6,5

1. Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad fue del 94,1%
La especificidad fue del 97,9%

Preparación de reactivos

Solución de lavado

Diluya todo el contenido del vial de la solución de lavado (20x) en 1 litro de H₂O destilada.

Diluyente de muestra/conjugado

Diluir 1:10 con agua destilada.

Conjugado

Prepare la solución de conjugado mediante una dilución 1:2000 con el diluyente de conjugado. Primero realice una dilución 1:50 (20µL de conjugado en 980µL de diluyente de muestra/conjugado) y luego transfiera 300µL de esta dilución a 12mL de diluyente de muestra/conjugado). La solución del conjugado que acaba de preparar es estable durante 24 horas.

Almacenamiento

Todos los reactivos han de mantenerse entre 2-8°C. Además, han de utilizarse antes de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del vial.

Toma de muestras

Para que el rendimiento del kit Helori CTX IgG sea óptimo se requiere suero en buen estado. Es importante conservar la integridad de la muestra de sangre desde su obtención hasta la realización del análisis. Las muestras se han de tomar de forma aséptica y no traumática mediante venopunción. Permita a la sangre coagularse durante por lo menos 20-30 minutos hasta que el coágulo empiece a formarse. Antes de la centrifugación, elimine la sangre coagulada de las paredes del tubo de recogida. No es necesario añadir conservantes al suero para mantener la integridad de la muestra. Los sueros deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de las 24 horas siguientes a la toma de la muestra. Si el análisis no se va a realizar en ese periodo de tiempo, las muestras deben congelarse a -20°C evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. Las muestras han de diluirse en proporción 1:100 (10µL de suero en 0,99mL de diluyente de muestra) antes de su uso. La estabilidad de las muestras diluidas es de 4°C durante 24 horas o de una semana a -20°C.

Procedimiento del ensayo

Defina el número de sueros apropiado para realizar el análisis. Prepare las muestras realizando una dilución 1:100 (10µL de suero en 0,99mL de diluyente de muestra) y mezcle bien. El calibrador, y los controles positivo y negativo suministrados con el kit están listos para su uso y no necesitan ninguna dilución.

1. Pipetee 100µL del diluyente de muestra/conjugado en los pocillos A1-B1.
2. Pipetee 100µL del calibrador en los pocillos C1-D1.
3. Pipetee 100µL del control positivo y negativo y las muestras diluidas en los pocillos restantes.
4. Cubra bien los pocillos para evitar la evaporación e incube durante 60 minutos a 37°C.
5. Tras la incubación, elimine el líquido totalmente.
6. Realice 3 lavados usando 200µL de la solución de lavado por pocillo.
7. Elimine el líquido totalmente.
8. Pipetee 100µL de la solución diluida de conjugado anti-IgG preparada con anterioridad en cada pocillo.
9. Incube los pocillos de la microplaca tapados durante 60 minutos a 37°C.
10. Repite los lavados tal y como se describe en el paso 6.
11. Pipetee 100µL del substrato cromogénico en cada pocillo.
12. Incube los pocillos de la microplaca tapados durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

13. Interrumpa la reacción añadiendo 100µL de la solución de parada. El color de la solución debería virar de azul a amarillo.

14. Realice la lectura de la fluorescencia a una longitud de onda de 450nm

Interpretación de los resultados

Determine el valor medio de DO del blanco, controles y muestras analizadas. Estos valores se han de comparar con los valores de las medias del calibrador. Reste el valor de DO del blanco de todos los resultados obtenidos. La concentración de cada muestra se expresa en unidades obtenidas de la siguiente fórmula:

$$\text{Unidad} = \frac{(\text{D.O. muestra}) \times \text{Valor Calibrador (Unidad)}}{(\text{D.O. Calibrador})}$$

El valor de la DO del calibrador ha de ser >0,600. El valor de las unidades del calibrador está impreso en la etiqueta del vial. No utilice calibradores de diferentes lotes.

Control de calidad

La DO del control negativo ha de ser siempre <0,100.

La DO del control positivo ha de ser siempre >0,800

Límites de referencia

Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan que cada laboratorio debería establecer su propio rango de valores normales analizando una cantidad estadísticamente significativa de muestras sin ninguna evidencia clínica de infección pasada o presente relacionada con la patología causada por *H. pylori*. El rango negativo suele establecerse como la media más dos veces la desviación estándar, mientras que el valor más bajo del positivo se establece como la media más tres veces la desviación estándar. El rango entre dos y tres desviaciones estándar incluye las muestras con valores limítrofes. Estos valores deberían ser analizados de nuevo. En consecuencia, cada laboratorio debería establecer su propio valor *cut-off*. Los análisis preliminares de muestras italianas mostraron los siguientes resultados:

Negativo	< 5 Unidad
Borderline	5 - 7,5 Unidad
Positivo	> 7,5 Unidad

Estos valores son sólo una recomendación y no han de prevalecer sobre el método de rutina de cada laboratorio.

Precauciones

La concentración de *Thymerosal* usada como conservante en las soluciones de los

reactivos es <0,05% (w/w). Evite contactos innecesarios. La solución de parada puede ser irritante para piel, ojos y tracto respiratorio en personas sensibles. Utilice siempre guantes adecuados para llevar a cabo esta prueba.

2. Extraiga todos los reactivos de la nevera y permita que alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlos (21-25°C). Vuelva a guardar los reactivos en el congelador tan pronto como haya terminado de utilizarlos.

3. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg y anticuerpos frente a VIH-1-2 y Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos.

4. Los componentes del kit no deben intercambiarse ni usar entre kits con diferente número de lote.

Bibliografía

1. Vaira D, Holton J, Miglioli M, *et al*. Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. Current opinion in Gastroenterology 1994; 10: 98-104.
2. Vaira D, Miglioli M, Mulè P, *et al*. Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. Gut 1994; 35: 309-12.
3. Figura N, Bugnoli M, Cusi MG, *et al*. Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*: production of cytotoxin. In: Malferheimer P. Ditschuneil H (ed): *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulcer; Springer, Berlin, 1990, p.86-95.
4. Weel JF, Van der Hulst RW, Gerrits Y, *et al*. The interrelationship between cytotoxin associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. J Infect Dis, 173:5, 1996 May, 1171-5.

Helori CTX IgG

Code 8723, 96 tests

Fecha de preparación

31.10.2004

Fabricado por:
ravo Diagnostika GmbH
Oltmannsstr. 5
79100 Freiburg
Germany



Distribuido por:

Eurospital

Eurospital SpA
34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39-040-8997-1 Fax +39-040-280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com