



Manual del usuario



# *Helicobacter pylori*

## *IgG ELISA*

IVD

**REF** EIA-3484

 Fabricante:



*DRG Instruments GmbH, Germany*

*Division of DRG International, Inc*

*Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg*

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)

E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distribuido por:





## Manual del usuario



96 Pozos



Fabricante:



*DRG Instruments GmbH, Germany*

*Division of DRG International, Inc*

*Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg*

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)

E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distribuido por:



## Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti

2	PRINCIPLE OF THE TEST; <b>ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>	
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	
4	KIT COMPONENTS .....	4
5	SPECIMEN.....	
6	ASSAY PROCEDURE.....	
7	RESULTS.....	7
8	QUALITY CONTROL.....	8
9	PERORMANCE CHARACTERISTICS; <b>ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>	
10	LIMITATIONS OF USE.....	10
11	LEGAL ASPECTS .....	10
12	REFERENCES / LITERATURE.....	10

1	EINLEITUNG .....	11
2	TESTPRINZIP .....	11
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	11
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	12
5	PROBENVORBEREITUNG.....	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	13
7	ERGEBNISSE .....	15
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	16
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	16
10	GRENZEN DES TESTES.....	16
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	17
12	REFERENZEN / LITERATUR .....	17

1	INTRODUZIONE .....	18
2	PRINCIPIO DEL TEST .....	18
3	PRECAUZIONI .....	18
4	COMPONENTI DEL KIT.....	19
5	CAMPIONI.....	20
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	21
7	RESULTATI.....	23
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	24
9	CARATTERISTICHE DEL TEST .....	24
10	LIMITAZIONI .....	24
11	ASPETTI LEGALI .....	25
12	BIBLIOGRAFIA.....	25

	SYMBOLS USED WITH DRG ELISAS .....	26
--	------------------------------------	----

	SHORT INSTRUCTIONS FOR USE .....	27
--	----------------------------------	----

## 1 INTRODUCCION

### 1.1 Uso Indicado

El **Kit inmunoensayo enzimático DRG Helicobacter pylori IgG (Recombinante)** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa y cualitativa de anticuerpos tipo IgG contra el Helicobacter pylori en suero y plasma humano.

**Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.**

### 1.2 Resumen y Explicación

El Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa en espiral (2-6.5 µm en tamaño, flagelada) la cual coloniza la mucosa gástrica humana. El organismo se encuentra en la capa mucosa y se adhiere a la superficie de la mucosa epitelial del estómago pero generalmente no penetra la mucosa gástrica directamente. Sin embargo, si hay una segunda respuesta inflamatoria en la mucosa conduce a una gastritis crónica activa. El Helicobacter pylori es el principal agente causante en la mayoría de casos de úlcera péptica.

En 1994 la Organización Mundial de la Salud clasificó el Helicobacter pylori como un carcinoma de categoría 1. La tasa de infección en Europa es aproximadamente del 30%-40%, en todo el mundo aproximadamente 50%. Existe una relación inversa entre la presencia de infección de Helicobacter pylori y el nivel socioeconómico. En países desarrollados, las personas adquieren la infección en una edad temprana, de tal manera que en la edad adulta cerca de un 90% de la población podría tener gastritis por Helicobacter pylori. En los países occidentales desarrollados la prevalencia de gastritis por Helicobacter pylori es mucho menor. En estas condiciones, la tasa de adquisición es mucho más lenta (aproximadamente 1% anual) y en la vejez, lo más probable es que estén infectados con la bacteria.

## 2 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit **DRG Helicobacter pylori IgG ELISA** es un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción ligado a enzima. (ELISA). Los pocillos de microtitulación como fase sólida están cubiertos con antígeno recombinante Cag A de Helicobacter pylori.

Las muestras diluidas del paciente y los controles listos para el uso se pipetean en éstos pozos. Durante la incubación los anticuerpos específicos contra el Helicobacter pylori de muestras y controles positivos se ligan a los antígenos inmovilizados.

Después de una etapa de lavado se remueven los anticuerpos no ligados y se adiciona el conjugado marcado con la peroxidasa de rábano picante anti IgG humana en los pozos. Durante una segunda incubación éste conjugado anti-IgG se une específicamente a los anticuerpos IgG produciendo complejos inmunes ligados a enzimas.

Después de un segundo lavado se remueve el conjugado no unido, y los complejos inmunes formados (en caso de resultados positivos) se detectan en la incubación con substrato TMB y el desarrollo de un color azul. El color azul cambia a amarillo al detener la reacción enzimática con el ácido sulfúrico.

La intensidad de éste color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos IgG de Helicobacter en la muestra del paciente. La absorbancia se lee a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación ELISA.

### 3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico in vitro. Para uso profesional únicamente.
- Antes de empezar la prueba, lea las instrucciones completa y cuidadosamente. Use la versión válida del inserto del empaque suministrado con el kit. Asegúrese de un entendimiento total.
- Todos los reactivos de éste kit que contienen suero o plasma humano han sido probados y confirmados negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV por procedimientos aprobados por la FDA. Todos los reactivos, sin embargo, deben ser tratados como riesgo biológico potencial en uso y eliminación.
- Evite el contacto con la solución de parada que contiene 0.2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este puede causar irritación y quemaduras en la piel.
- El substrato TMB tiene un efecto irritante de piel y mucosa. En caso de posible contacto, lave los ojos con un volumen abundante de agua y la piel con jabón y agua abundante. Lave los objetos contaminados antes de reusarlos. En caso de inhalación, lleve a la persona al aire libre.
- La microplaca contiene tiras que se pueden romper. Los pozos no usados deben ser almacenados entre 2 °C a 8 °C en el empaque de aluminio provisto.
- El pipeteo de las muestras y los reactivos debe hacerse lo más rápido posible y en la misma secuencia para cada paso.
- Use recipientes solo para los reactivos individuales. Esto principalmente aplica para los recipientes del substrato. Si se usa un recipiente para servir la solución de substrato que ha sido previamente usada para el conjugado ésta puede cambiar de color. No devuelva los reactivos a los frascos ya que se pueden contaminar los reactivos.
- Mezcle el contenido de los pozos de la microplaca muy bien para asegurar buenos resultados de la prueba. No reutilice los micropozos.
- No permita que durante la prueba se sequen los pozos; adicione los reactivos inmediatamente después de completar las etapas de lavado.
- Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiental (21 °C – 26 °C) antes de iniciar la prueba. La temperatura afecta las lecturas de absorbancia de la prueba. Sin embargo, los valores de las muestras de pacientes no se afectarán.
- Nunca pipetee con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas.
- No fume, coma, beba ni se maquille en las áreas donde se manejen las muestras o los reactivos del kit.
- Use guantes de látex desechables cuando manipule muestras y reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos y de las muestras puede dar falsos resultados.
- El manejo debe hacerse de acuerdo con los procedimientos definidos por una apropiada guía o regulación nacional de riesgo biológico.
- No use reactivos después de la fecha de expiración indicada en la etiqueta del kit.
- Todos los volúmenes indicados se han realizado de acuerdo al protocolo. Resultados óptimos de la prueba se obtendrán solamente cuando se usan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezcle o use reactivos de kits con diferente número de lote. Se recomienda no intercambiar pozos de distintas placas incluso del mismo lote. Estos kits pudieron ser transportados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar un poco diferentes.
- Los productos químicos o reactivos preparados o usados deben tratarse como desecho peligroso de acuerdo a la guía o regulación nacional de riesgo biológico.
- Para información sobre sustancias peligrosas incluidas en el kit, por favor diríjase a las hojas de Seguridad. Las hojas de seguridad para éste producto están disponibles bajo requerimiento directamente a DRG.

## 4 COMPONENTES DEL KIT

### 4.1 Contenido del Kit

1. **Microplaca de titulación**, 12 x 8 (Se pueden partir) tiras, 96 pozos; Pozos recubiertos con antígeno recombinante Cag A de Helicobacter pylori. (incl. 1 un soporte de tiras y una lámina para cubrir)
2. **Diluyente de muestras \***, 1 vial, 100 mL, listo para usar, Color amarillo; pH  $7.2 \pm 0.2$ .
3. **Estandar (Estandar 1 - 3)\***, 3 viales, S1 - S3 2.0 mL, listo para usar; Concentraciones: 15, 75, 150 DU/mL (DU/mL = DRG U/mL), Color amarillo, tapas blancas.
4. **Control Positivo \***, 1 vial, 2.0 mL, listo para usar; Color amarillo, tapa roja.
5. **Control Negativo (Standard 0) \***, 1 vial, 2.0 mL, listo para usar; Color amarillo, tapa amarilla.
6. **Enzima Conjugada \***, 1 vial, 20 mL, listo para usar, Color rojo, anticuerpo anti IgG humana conjugada marcada con peroxidasa de rábano picante.
7. **Solución Substrato**, 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **Solución de parada**, 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Evite el contacto con la solución de parada. Esta puede causar irritaciones y quemaduras en la piel.
9. **Solución de Lavado \***, 1 vial, 30 mL (20X concentrada para 600 mL), pH  $6.5 \pm 0.1$  Ver „Preparación of Reactivos“.

\* Contiene conservante sin mercurio

#### 4.1.1 Equipo y material requerido pero no suministrado

- Un lector calibrado de placas de titulación (450/620nm  $\pm$  10 nm) (e.j. El equipo lector de placas de titulación DRG)
- Micropipetas de precisión de volumen variable calibradas.
- Incubador 37 °C
- Equipo manual o automatizado para lavar los pozos.
- Agitador para mezclar los tubos
- Agua destilada o desionizada (fresca).
- Cronómetro
- Papel absorbente

### 4.2 Condiciones de Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena entre 2 °C a 8 °C los reactivos sin abrir pueden conservar su reactividad hasta la fecha de expiración. No use reactivos después de ésta fecha.

Los reactivos abiertos deben almacenarse de 2 °C a 8 °C. La placa microtituladora debe almacenarse de 2 °C a 8 °C. Una vez el empaque de aluminio ha sido abierto, tener cuidado de cerrarlo herméticamente de nuevo.

Los kits abiertos mantienen su actividad por dos meses si se almacenan como se describe arriba.

### 4.3 Preparación de los Reactivos

Deje todos los reactivos y número de tiras requerido que alcancen temperatura ambiente antes de usar.

#### **Solución de Lavado**

Diluya la Solución de Lavado **1+19** (e.j. 10 mL + 190 mL) con agua bidestilada fresca y libre de gérmenes. Esta solución de lavado diluida tiene un valor de pH de  $7.2 \pm 0.2$ .

Consumo: ~ 5 mL por determinación.

Los cristales en la solución desaparecen calentándola a 37 °C en baño de maría. Asegúrese que los cristales están completamente disueltos antes del uso.

La Solución de Lavado diluida ese estable por 4 semanas de 2 °C a 8 °C.

#### 4.4 Eliminación del kit

La eliminación del kit debe hacerse de acuerdo a la regulación nacional. Información especial de éste producto es suministrada en la Hoja de Seguridad (Ver capítulo 13 de ésta hoja de seguridad).

#### 4.5 Kits de Prueba Dañados

En caso de cualquier daño severo del kit o sus componentes, DRG tiene que ser informado por escrito, a más tardar, una semana después de recibir el kit. Componentes individuales severamente dañados no deben ser usados para correr una prueba. Estos tienen que ser almacenados hasta que se encuentre una solución final. Después de esto, éstos deben ser eliminados de acuerdo a la regulación oficial.

### 5 MUESTRA

Suero o plasma puede usarse en ésta prueba.  
No use muestras hemolisadas, ictericas o lipémicas.

#### 5.1 Recolección de la muestra

##### Suero:

Obtener la sangre por venipunción (e.j. Sarstedt Monovette para suero), deje coagular, y separe el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugue antes de que coagule completamente. Los pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren mayor tiempo para la coagulación.

##### Plasma:

La sangre total debe ser tomada en tubos que contengan anticoagulante (e.j. Sarstedt Monovette con la apropiada preparación del plasma) y centrifugar inmediatamente después de la recolección.

#### 5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden almacenarse hasta por 3 días de 2 °C a 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por más tiempo deben congelarse una sola vez a -20 °C antes de la prueba. Las muestras descongeladas se deben invertir varias veces antes del ensayo.

#### 5.3 Dilución de las muestras

Antes del ensayo diluir cada muestra de paciente **1+100** con Diluyente de Muestras; e.j. 10 µL de muestra + 1 mL de Diluyente de Muestra **mezclar bien, dejar en reposo por 15 minutos mezclar bien antes del uso.**

**Por favor tenga en cuenta:** Los Estándares y Controles están listos para el uso y no deben ser diluidos!

### 6 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

#### 6.1 Observaciones Generales

- **Es muy importante llevar todos los reactivos, muestras y controles a temperatura ambiente antes de iniciar la corrida de la prueba!**
- Una vez se ha iniciado la prueba, todos los pasos se deben completar sin interrupción.
- Utilice puntas plásticas desechables para pipeta para cada estandar, control o muestra con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- La absorbancia es proporcional al tiempo y temperatura de incubación. Antes de iniciar la prueba, se recomienda que todos los reactivos estén listos, tapas removidas, todos los pozos necesarios asegurados en el soporte, etc. Esto asegurará lapsos de tiempo iguales para cada paso de pipeteo sin interrupción.
- Como regla general la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura.
- Cierre bien los frascos de los reactivos inmediatamente después del uso para evitar la evaporación y la contaminación microbiana.
- Para evitar contaminación cruzada y resultados falsamente elevados pipetee las muestras de los pacientes y sirva el conjugado con precisión sin salpicar en el fondo de los pocillos.
- Durante la incubación a 37°C cubra los micropozos con papel de aluminio para evitar la evaporación.

## 6.2 Procedimiento del ensayo

Antes de comenzar la prueba, diluya la solución de lavado, **prepare las muestras de pacientes como se describe en el punto 5.3**, mezcle bien antes de pipetear y establezca cuidadosamente el plan de identificación y distribución suministrado en el kit para todas las muestras, estándares y controles.

1. Seleccione el número requerido de tiras o micropozos sueltos e insértelos en el soporte.

Por favor asignar por lo menos:

1 pozo	(e.j. A1)	Para el blanco de sustrato,
1 pozo	(e.j. B1)	Para el control Negativo (Estandar 0),
3 pozos	(e.j. Desde C1 en)	Para los estándares de 1-3
1 pozo	(e.j. F1)	Para el control Positivo

Se le sugiere al usuario realizar los controles y las muestras de los pacientes por duplicado.

2. Servir

<b>100 µL</b> de <i>Control Neg.</i>	en el pozo B1
<b>100 µL</b> de <i>Estandar 1</i>	en el pozo C1
<b>100 µL</b> de <i>Estandar 2</i>	en el pozo D1
<b>100 µL</b> de <i>Estandar 3</i>	en el pozo E1
<b>100 µL</b> de <i>Control Pos.</i>	en el pozo F1 y

**100 µL** de cada muestra diluida con una nueva punta desechable en los pozos apropiados.  
Deje el pozo A1 para el blanco de sustrato!

3. Cubra los pozos con la cubierta de aluminio suministrada con el kit. Incube por **60 minutos a 37 °C**.
4. Elimine rápidamente el contenido de los pozos.  
Lave los pozos **5 veces con Solución de Lavado diluida (300 µL por pozo)**. Sacuda los pozos fuertemente sobre papel absorbente para remover las gotas residuales.  
**Nota Importante:**  
La sensibilidad y precisión de ésta prueba están marcadamente influenciadas por una correcta realización del procedimiento de lavado!
5. Agregue **100 µL Enzima Conjugada** en cada pozo, **excepto en A1**.
6. Incube por **30 minutos a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)**.  
*No exponga a la luz directa del sol!*
7. Sacuda rápidamente el contenido de los pozos.  
Lave los pozos **5 veces con Solución de Lavado diluida (300 µL por pozo)**. Sacuda los pozos fuertemente sobre papel absorbente para remover las gotas residuales.
8. Adicione **100 µL** de Solución de *Substrato* en todos los pozos.
9. Incube por **exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) en la oscuridad**.
10. Detenga la reacción enzimática adicionando **100 µL** de *Solución de Parada* a cada pozo.  
Cualquier desarrollo de color azul durante la incubación se tornará amarillo.  
**Nota:** Muestras de pacientes altamente positivas pueden causar precipitados oscuros del cromógeno!
11. Lea la densidad óptica a **450/620 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 30 minutos** después de adicionar la Solución de Parada.

## 6.3 Medición

**Ajuste** el lector de ELISA de microplatos o microtiras **a cero** usando el **blanco de sustrato en el pozo A1**.

Si – debido a razones técnicas – el lector de ELISA no puede ser ajustado a cero usando el blanco de sustrato en el pozo A1, reste el valor de la absorbancia del pozo A1 de las otras mediciones de absorbancia para obtener resultados confiables!

**Mida la absorbancia** de todos los pozos **a 450 nm** y registre los valores de absorbancia para cada control y muestras de pacientes en el plan de distribución e identificación.

Se recomienda la longitud de onda dual usando 620 nm de longitud de onda como referencia.

En éste caso calcular los valores de absorbancia media de todos los duplicados.



## 7 RESULTADOS

### 7.1 Validación de la Prueba

La prueba se puede considerar válida siempre y cuando se cumplan los siguientes requisitos:

<b>Blanco de Substrato en A1:</b>	Valor de Absorbancia <b>menor a 0.10</b>
<b>Control Neg.</b> (Estandar 0) <b>en B1</b>	Valor de Absorbancia <b>menor a 0.20</b>
<b>Estandar 1(Punto de corte) en C1 :</b>	Valor de Absorbancia <b>entre 0.35 – 0.85</b>
<b>Estandar 2 en D1 :</b>	Valor de Absorbancia <b>entre 0.90 – 2.10</b>
<b>Estandar 3 en E1 :</b>	Valor de Absorbancia <b>entre 1.80 – 3.00</b>
<b>Control Pos. en F1:</b>	Valor de Absorbancia <b>entre 0.65 – 3.00</b>

### 7.2 Cálculo de Resultados cuantitativos

Para obtener resultados **cuantitativos en DU/mL** grafique los valores de absorbancia (promedio) del *Control Neg.* (Estandar 0) y *Estandar 1, 2 y 3* sobre papel milimetrado (linear/linear) en un sistema de coordenadas contra sus concentraciones correspondientes (0, 15, 75, 150 DU/mL) y trace una curva de calibración estándar (valores de absorbancia sobre el eje vertical "y", las concentraciones sobre el eje horizontal "x").

Lea los resultados a partir de ésta curva estandar empleando los valores de absorbancia (promedio) de cada muestra de paciente y control.

Todos los programas de computador disponibles pueden usarse para el cálculo y lectura de resultados automatizados. Las siguientes funciones matemáticas pueden ser usadas: Cálculo de la curva estándar: Regresión Linear o punto a punto.

*NOTA: Para pacientes con concentración superior al estandar 3, se debe analizar una segunda muestra diluida 1:10 de la dilución inicial 1 + 100 del paciente, adicionalmente los valores de muestras de pacientes diluidas (1:10) deben ser multiplicados por el apropiado factor de dilución para obtener resultados correctos! (Dilución: 1:10 = Factor de dilución : 10). (Ver capítulo "5.3 Dilución de la Muestra").*

### 7.3 Interpretación de resultados cuantitativos

Los rangos de valores normales para éste ELISA deben ser establecidos por cada laboratorio basados en su propia población de pacientes en el área geográfica atendida.

Los valores siguientes deben ser considerados como una guía:

<b>PUNTO DE CORTE</b>	<b>15 DU/mL</b>
<b>POSITIVO</b>	<b>&gt; 18 DU/mL</b>
<b>ZONA GRIS (dudoso):</b>	<b>15 - 18 DU/mL</b>
<b>NEGATIVO:</b>	<b>&lt; 15 DU/mL</b>

### 7.4 Cálculo de resultados cuantitativos

Valor de absorbancia del **Estandar 1 (Punto de corte= Cut-off) = CO**

*Ejemplo:* 0.56 = CO

### 7.5 Interpretación de resultados cuantitativos

**POSITIVO** Valor de absorbancia del paciente (promedio) valor de más de 20 % por encima del CO  
(Promedio de DO del paciente > 1.2 x CO)

**ZONA GRIS** Valores de absorbancia del paciente (promedio) desde CO hasta 20% por encima del CO  
Repetir la prueba de 2 - 4 semanas después – con nueva muestra del paciente.  
(CO ≤ Promedio DO paciente ≤ 1.2 x CO)  
Resultados en la segunda prueba de nuevo en zona gris ⇒ **NEGATIVE**

**NEGATIVO** Valores de absorbancia del paciente (promedio) valores de absorbancia por debajo del CO  
(Promedio de DO del paciente < CO)

## 8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo a la reglamentación estatal y federal. El uso de muestras control es recomendable para asegurar la validación de resultados diariamente. Use controles de nivel normal y patológico.

También se recomienda hacer uso de los programas nacionales e internacionales de evaluación de la calidad para asegurar la exactitud de los resultados.

Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos establecidos como aceptables de los controles, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.

En este caso, por favor revise las siguientes áreas técnicas: Dispositivos de pipeteo y temporización; fotómetro, fechas de expiración de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de revisar los puntos mencionados arriba sin encontrar algún error, contacte a su distribuidor de DRG directamente.

## 9 CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO

### 9.1 Rango Dinámico de la Prueba

El rango de la prueba está entre 0.014 – 150 DU/mL.

### 9.2 Especificidad del Antígeno (Reactividad cruzada)

El antígeno usado para el ELISA DRG H.pylori IgG no muestra reactividad cruzada relevante para Brucella abortus, Candida albicans, Chlamydia trachomatis, Treponema pallidum, Mycoplasma pneumonia, Echinococcus, Fasciola y Toxoplasma gondii.

### 9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica del ELISA DRG se calculó adicionando 2 desviaciones estándar a partir de la media de 20 análisis por duplicado del control negativo, encontrándose un valor de 0.014 DU/mL.

### 9.4 Especificidad del Diagnóstico

La especificidad del diagnóstico se define como la probabilidad de la prueba de ser negativa en la ausencia de analitos específicos. (Detectado por el método de comparación Mikrogen ELISA con tres lotes de DRG ELISA, 79 muestras, de éstas mismas 10 muestras negativas son analizadas.)

Esto es 100% (Para todos los tres lotes de producción de DRG).

### 9.5 Sensibilidad del Diagnóstico

La sensibilidad del diagnóstico se define como la probabilidad de la prueba de ser positiva en la presencia de analitos específicos. (Detectado por el método de comparación Mikrogen ELISA con tres lotes de DRG ELISA, 79 muestras, de éstas mismas 69 muestras positivas son analizadas.)

Esto es 100% (Para todos los tres lotes de producción de DRG).

### 9.6 Comparación del Método

El ELISA DRG fue comparado con Mikrogen H.pylori IgG ELISA. 79 muestras de suero son analizadas

n= 79		Mikrogen ELISA	
		pos.	neg.
DRG ELISA Lote 1	pos.	69	0
	neg.	0	10

**Concordancia: 100%**

## 9.7 Reproducibilidad

9.7.1 La precisión del **intra-ensayo** (corrida en) del H.pylori IgG ELISA DRG se determinó por 20 mediciones de 12 muestras de suero que cubren todo el rango de medición.

Muestra	Conc. Media (DU/mL)	CV (%)	Intra-Ensayo	n
1	2,51	<b>9,42</b>		20
2	2,40	<b>9,70</b>		20
3	10,75	<b>6,95</b>		20
4	20,43	<b>5,94</b>		20
5	23,36	<b>7,09</b>		20
6	26,67	<b>6,80</b>		20
7	39,00	<b>2,91</b>		20
8	23,36	<b>7,09</b>		20
9	45,61	<b>6,63</b>		20
10	127,32	<b>2,81</b>		20
11	128,74	<b>2,53</b>		20
12	148,76	<b>2,52</b>		20

9.7.2 La **variación del inter-assay** de H.pylori IgG ELISA DRG se determinó con 3 muestras con 2 kits de producción en 10 corridas independientes con 2 duplicados por corrida.

Muestra	Conc. Media (DU/mL)	CV (%)	Inter-Ensayo	n
1	74,63	<b>8,18</b>		40
2	57,52	<b>4,67</b>		40
3	143,21	<b>4,95</b>		40

## 9.8 Recuperación

A las muestras se les ha adicionado 3 soluciones con concentraciones conocidas en relación 1:1. El % de recuperación ha sido calculado multiplicando la relación de las mediciones y los valores esperados con 100 ( $\text{valor esperado} = (\text{valor endógeno} + \text{valor adicionado}) / 2$ ; Debido a la dilución 1:2 del suero con el material adicionado).

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
<b>Concentración [DU/mL]</b>	8,67	27,48	14,80
<b>Recuperación Media</b>	100,0	100,0	98,2
<b>Rango de Recuperación [%]</b>	desde	88,5	97,5
	hasta	113,5	101,4

## 9.9 Linearidad

Tres muestras (suero) que contienen diferentes cantidades de analito fueron diluidas con diluyente de muestra y analizadas con ELISA DRG. El porcentaje de recuperación se calculó comparando los valores esperados y los valores medidos para el analito.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
<b>Concentración [DU/mL]</b>	112,75	151,27	144,89
<b>Recuperación Media</b>	93,9	99,9	102,4
<b>Rango de Recuperación [%]</b>	desde	91,6	85,9
	hasta	97,6	110,5

## 10 LIMITACIONES DE USO

La contaminación bacteriana o ciclos repetidos de congelación-descongelación de la muestra puede afectar los valores de absorbancia.

Los resultados serológicos en pacientes inmunocomprometidos y en neonatos éstos resultados tienen valor restringido.

### 10.1 Sustancias Interferentes

Hemoglobina (Hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (Hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (Hasta 30 mg/mL) no influyen en los resultados de la prueba.

## 11 ASPECTOS LEGALES

### 11.1 Confiabilidad de los Resultados

La prueba debe realizarse exactamente como lo indica el fabricante. The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Además, el usuario debe seguir estrictamente las reglas de GLP (Good Laboratory Practice= Buenas Prácticas de Laboratorio) u otras normas y/o leyes aplicables nacionalmente. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos de control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento, un número suficiente de controles para validar la exactitud y precisión de la prueba.

Los resultados de la prueba son válidos solamente si todos los controles están dentro de los rangos especificados y si todos los demás parámetros de la prueba están también dentro de las especificaciones dadas en la prueba. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. En caso de cualquier duda e inquietud, por favor póngase en contacto con DRG.

### 11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las Consecuencias terapéuticas no deben nunca basarse solamente en los resultados del laboratorio aun si todos los Resultados de la prueba están de acuerdo con lo expuesto en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solo una parte del total del cuadro clínico de un paciente.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se debe establecer sobre la base de un solo resultado de prueba. Un diagnóstico preciso se debe tomar considerando la historia clínica, sintomatología como también los datos serológicos.

Solamente en casos donde los Resultados de laboratorio están de acuerdo con todo el cuadro clínico del paciente debe considerarse una terapia o tratamiento.

El resultado de la prueba por sí mismo nunca debe ser solamente el determinante para derivar un procedimiento terapéutico.

### 11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación al kit de prueba y/o intercambio o mezcla de lotes diferentes de un kit a otro puede afectar negativamente los resultados y la validación de todas las pruebas. Tal modificación y/o intercambio invalida cualquier reclamo o reemplazo.

Los reclamos presentados debido a la mala interpretación de los clientes de los resultados de laboratorio tratados en el punto 11.2. también son inválidos. De todos modos, en el caso de cualquier reclamo, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al kit durante el transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

## 12 REFERENCIAS / LITERATURA

1. Stolte, M. Eidt, S. (1993) Healing gastric MALT lymphomas by eradicating H.Pylori Lancet 342:568
2. Stolte, M. (1992) H.Pylori and gastric MALT lymphoma Lancet 339:745-746
3. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vanderstetten, D.P., Chang, y., Vogelmann, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K. (1991) H. Pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 325: 1127-1131
4. Warren J.R. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithellUm in active chronic gastritis, Lancet: 1273-1275
5. Marshall, B.J., Royce, H., D.I., Goodwin, C.S., Taylor, N.S., Edmonds, P., Sly, L.I., Brenner, D.J. (1982) Original Isolation of Campylobacter pyloridis from human gastric mucosa. Microbios Letter 25:83

## 1 EINLEITUNG

Der **DRG Helicobacter pylori IgG ELISA (Recombinant)** wird zum **quantitativen** und **qualitativen** Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Helicobacter pylori in Humanserum und -Plasma eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der **DRG Helicobacter pylori IgG ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay.

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit rekombinatem Helicobacter pylori Cag A Antigen beschichtet. In diese Vertiefungen werden **verdünnte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipettiert.

Während der darauf folgenden Inkubation werden Helicobacter pylori-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden.

Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Kontroll- und Probenmaterial wird Anti-human-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das sich während einer weiteren Inkubation spezifisch an IgG-Antikörper bindet und dadurch zur Bildung enzymmarkierter Immunkomplexe führt. Durch einen zweiten Waschvorgang wird ungebundenes Konjugat entfernt.

Die (bei positiven Resultaten) gebildeten Immunkomplexe werden durch Inkubation mit TMB-Substrat anhand einer blauen Farbreaktion, die nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure in gelb umschlägt, sicht- und messbar gemacht.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Anti-Helicobacter pylori-Antikörpermenge in der Patientenprobe direkt proportional.

Die Extinktionsmessung bei 450 nm erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Sicherheitsdatenblätter entsprechen den EU-Verordnungen.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit rekombinantem Helicobacter pylori Cag A -Antigen beschichtet;  
(inkl. 1 Streifenhalter und 1 Abdeckfolie)
2. **Sample Diluent** \* (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 100 mL, gebrauchsfertig;  
gelb gefärbt; pH 7,2 ± 0,2
3. **Standard (Standard 1-3)**\*, 3 Fläschchen, S1 – S3 2,0 mL, gebrauchsfertig;  
Konzentrationen: 15, 75, 150 DU/mL (DU/mL = DRG Units/mL),  
gelb gefärbt, weiße Kappen.
4. **Pos. Control** \* (Positive Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;  
gelb gefärbt, rote Kappe.
5. **Neg. Control** \* (Negative Kontrolle, Standard 0), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;  
gelb gefärbt, gelbe Kappe.
6. **Enzyme Conjugate** \* (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig;  
rot gefärbt,  
Antikörper gegen humanes IgG, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Tetramethylbenzidin (TMB).
8. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 0,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **Wash Solution** \* (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, (**20X** konzentriert für 600 mL) pH 6,5 ± 0,1;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

\* Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel

#### 4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter, (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Vortex-Mischer
- Aqua dest.
- Kurzzeitwecker
- Saugfähiges Papier

### 4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die *Microtiterwells* sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

### 4.3 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

#### **Wash Solution**

Waschlösung **1+19** (z.B. 10 mL + 190 mL) mit frischem, keimfreiem destilliertem Wasser verdünnen. Diese verdünnte Waschlösung hat einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2.

Bedarf: ca. 5 mL pro Bestimmung.

Kristalle in der Lösung durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C auflösen. Es muss sichergestellt sein, dass die Kristalle vollständig gelöst sind, bevor die Waschlösung verwendet wird.

*Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C bis 8 °C für 2 Wochen stabil.*

#### 4.4 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen zu diesem Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

#### 4.5 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

### 5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

#### 5.1 Probenentnahme

##### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

##### Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulanzen enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

#### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren, bei –20 °C, bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

#### 5.3 Probenverdünnung

Vor Testbeginn müssen die Patientenproben **1 + 100** mit *Sample Diluent* verdünnt werden;

z.B. 10 µL Probe + 1 mL *Sample Diluent* **gut mischen, 15 Minuten stehen lassen nochmals gut mischen.**

**Achtung:** Standards und Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

### 6 TESTDURCHFÜHRUNG

#### 6.1 Allgemeine Hinweise

- **Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien, Proben und Kontrollen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen!**
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Nach Anbruch des Testkits und anschließender Lagerung die Konjugat- und Kontroll-Fläschchen vor der Weiterverwendung auf eventuelle mikrobielle Kontamination hin prüfen.
- Die Patientenproben bzw. das Konjugat sorgfältig auf den Boden der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren (ohne den Rand zu benetzen!), um Kreuzkontaminationen und fälschlich erhöhte Ergebnisse zu vermeiden.
- *Microtiterwells* während der 37°C Inkubation durch Abdecken mit Abdeckfolie vor Verdunstung schützen.

## 6.2 Testdurchführung

Vor Beginn der Testdurchführung die *Wash Solution* verdünnen, die **Patientenproben vorbereiten, wie unter Punkt 5.3 beschrieben, vor dem Pipettieren gut mischen** und auf dem mitgelieferten **Übersichtsplan** die Verteilung bzw. Position der Patientenproben, Standards und Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen zur sicheren Identifizierung genau festlegen.

1. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen in den Streifenhalter einsetzen.  
Hierbei mindestens  
1 Vertiefung (z.B. A1) für den Substratleerwert (Blank)  
1 Vertiefung (z.B. B1) für die *Neg. Control* (Standard 0)  
3 Vertiefungen (z.B. ab C1) für die *Standards 1 – 3* vorsehen und  
1 Vertiefung (z.B. F1) für die *Pos. Control*.  
Es bleibt dem Anwender überlassen, zur höheren Sicherheit für die Kontrollen und die Patientenproben Doppel- oder Mehrfachbestimmungen vorzusehen.
2. **100 µL *Neg. Control*** in Vertiefung B1  
**100 µL *Standard 1*** in Vertiefung C1  
**100 µL *Standard 2*** in Vertiefung D1  
**100 µL *Standard 3*** in Vertiefung E1  
**100 µL *Pos. Control*** in Vertiefung F1 und  
**100 µL** jeder verdünnten Patientenprobe mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.  
Vertiefung A1 für den Substratleerwert (Blank) reservieren!
3. Die Mikrotiterstreifen mit der dem Testkit beiliegenden Folie abdecken.  
**60 Minuten bei 37 °C** inkubieren.
4. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Testes wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
5. **100 µL *Enzyme Conjugate*** in jede Vertiefung geben, **außer in A1**.
6. Die Mikrotiterstreifen **30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C)** inkubieren.  
*Testansatz nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!*
7. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **100 µL *Substrate Solution*** in jede Vertiefung geben.
9. Die Mikrotiterstreifen **15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) im Dunkeln** inkubieren
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL *Stop Solution*** in jede Vertiefung abstoppen.  
Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.  
**Hinweis:** Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen!
11. Die Optische Dichte bei **450/620 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **30 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.



### 6.3 Messung

Mit Hilfe des **Substratleerwertes (Blank) in A1 den Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Kalibrierung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

**Extinktion aller Vertiefungen bei 450 nm messen** und die Messwerte der Kontrollen und Proben in den Übersichtsplan eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den Mittelwert der Extinktionswerte berechnen.

## 7 ERGEBNISSE

### 7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Die Testdurchführung ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

<b>Substrat-Leerwert in A1:</b>	Extinktion <b>niedriger als 0,10</b>
<b>Neg. Control in B1:</b>	Extinktion <b>niedriger als 0,20</b>
<b>Standard 1 (Cut-off) in C1:</b>	Extinktion <b>zwischen 0,35 und 0,85</b>
<b>Standard 2 in D1:</b>	Extinktion <b>zwischen 0,90 und 2,10</b>
<b>Standard 3 in E1:</b>	Extinktion <b>zwischen 1,80 und 3,00</b>
<b>Pos. Control in F1:</b>	Extinktion <b>zwischen 0,65 und 3,00</b>

### 7.2 Messwertberechnung der quantitativen Ergebnisse

Um **quantitative Ergebnisse in DU/mL** zu erhalten, die Extinktionswerte der *Neg. Control* und *Standard 1, 2 und 3* gegen ihre entsprechende Konzentration (0, 15, 75, 150 DU/mL) auftragen und eine Standardkurve erstellen (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse). Anhand dieser Standardkurve die gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen Patientenproben ablesen.

Im Handel erhältliche Auswertungsprogramme ermöglichen eine automatische Erstellung der Standardkurve und Kalkulation der Ergebnisse. Zur Berechnung der Standardkurve können die lineare Regression bzw. „Punkt zu Punkt“-Funktionen gewählt werden.

Achtung: Die Werte von *zusätzlich* (z.B. 1:10) *verdünnten Proben* müssen nach dem Ablesen mit dem *entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert* werden! (Verdünnung 1:10; Verdünnungsfaktor: 10)

### 7.3 Interpretation der quantitativen Ergebnisse

Normwert-Bereiche für diesen ELISA sollten, basierend auf dem entsprechenden Patientenkollektiv im jeweiligen Einzugsgebiet, individuell von jedem Labor erstellt werden.

Folgende Angaben gelten als Richtlinien:

<b>CUT-OFF</b>	<b>15 DU/mL</b>
<b>POSITIV:</b>	<b>&gt; 18 DU/mL</b>
<b>GRAUZONE:</b>	<b>15 – 18 DU/mL</b>
<b>NEGATIV:</b>	<b>&lt; 15 DU/mL</b>

### 7.4 Qualitative Testauswertung

**Extinktionswert des Standard 1 (Cut-off [CO])**

*Beispiel:* 0.560 = CO

### 7.5 Interpretation qualitativen Auswertung

**POSITIV** Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 20% oberhalb des CO.  
(Mittlere OD Probe > 1.2 x CO)

**GRAUZONE** Patienten-Extinktions(mittel)werte von CO bis zu 20 % oberhalb CO.  
Test 2 - 4 Wochen später wiederholen - mit frischer Patientenprobe.  
(CO ≤ Mittlere OD Probe ≤ 1.2 x CO)  
Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone ⇒ **NEGATIV.**

**NEGATIV** Patienten-Extinktions(mittel)werte unterhalb des CO  
(Mittlere OD Probe < CO)

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Wenn die Ergebnisse des Testes nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,014 – 150 DU/mL.

### 9.2 Spezifität des Antigens (Kreuzreaktivität)

Das verwendete Antigen für den DRG H.pylori IgA ELISA zeigt keine relevante Kreuzreaktivität zu Brucella abortus, Candida albicans, Chlamydia trachomatis, Treponema pallidum, Mycoplasma pneumonia, Echinococcus, Fasciola und Toxoplasma gondii.

### 9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung der neg. Kontrolle (n = 20), beträgt 0,014.

### 9.4 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch einen Vergleich mit Mikrogen H.pylori IgG ELISA über 3 DRG Produktionschargen mit 79 Proben, davon 10 negative.)

Sie beträgt 100% für alle drei DRG Produktionschargen.

### 9.5 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch einen Vergleich mit Mikrogen H.pylori IgG ELISA über 3 DRG Produktionschargen mit 79 Proben, davon 69 positive)

Sie beträgt 100% für alle drei DRG Produktionschargen.

Die Daten zu:

### 9.6 Methodenvergleich

### 9.7 Reproduzierbarkeit (Präzision)

### 9.8 Wiederfindung

### 9.9 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung (Seite 9 und 10).

## 10 GRENZEN DES TESTES

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

### 10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in Punkt 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## **12 REFERENZEN / LITERATUR**

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 1 INTRODUZIONE

L'immunoassay enzimatico **DRG Helicobacter pylori IgG (Recombinant)** fornisce materiale per la determinazione **quantitativa** e **qualitativa** di anticorpi della classe IgG per Helicobacter pylorii nel siero e plasma.

**Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit **DRG Helicobacter pylori IgG ELISA** è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati. Micropozzetti come fase solida sono ricoperti con l'antigene Helicobacter pylorii (ricombinante Cag A).

**Campioni diluiti** di pazienti e **controlli pronti all'uso** sono pipettati in questi micropozzetti.

Durante l'incubazione gli anticorpi specifici contro Helicobacter pylorii di campioni positivi e dei controlli si legano agli antigeni immobilizzati. Dopo i passaggi di lavaggio per rimuovere materiali dei campioni e controlli non legati, anticorpi anti-IgG umano coniugati alla perossidasi di rafano sono aggiunti ai pozzetti. Durante una seconda incubazione questi coniugati anti-IgG si legano in maniera specifica agli IgG anticorpi, risultando nella formazione di complessi immunologici-enzimatici.

Dopo un secondo passaggio di lavaggio per rimuovere coniugati non legati, i complessi immunologici formati (nel caso di risultati positivi) sono evidenziati dalla incubazione del substrato TMB e da conseguente sviluppo di un colore blu. Il colore blu vira nel giallo dopo l'arresto della reazione enzimatica indicatore con acido sulfidrico.

L'intensità di questo colore è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo IgG Helicobacter pylorii-specifico nel campione del paziente. L'assorbanza a 450 nm viene determinata con un spettrofotometro ELISA per micropozzetti.

## 3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU.

## 4 COMPONENTI DEL KIT

### 4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti  
Pozzetti ricoperti con Helicobacter pylorii antigene Cag A (recombinate),  
(include 1 supporto per pozzetti e 1 fogli di copertura)
2. **Sample Diluent** \* (Diluente dei campioni), 1 flacone, 100 mL, pronto all'uso,  
colore giallo, pH 7.2± 0.2.
3. **Standard (Standard 1 – 3)** \*, 3 flaconi, S1 – S3 á 2.0 mL, pronto all'uso;  
Concentrazioni: 15, 75, 150 DU/mL (DU/mL = DRG Units/mL),  
colore giallo, tappi bianchi.
4. **Pos. Control** \* (Controllo positivo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;  
colore giallo, tappo rosso.
5. **Neg. Control** \* (Controllo negativo, Standard 0), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;  
colore giallo, tappo giallo.
6. **Enzyme Conjugate** \* (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso;  
colore rosso,  
anticorpo a IgG umano coniugato alla perossidasi di rafano.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso  
TMB (benzidine tetrametilico).
8. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;  
contiene 0.2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **Wash Solution** \* (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (20 X concentrato per 600 mL), pH 6.5 ± 0.1  
vedi „Preparazione dei reagenti“.

\* Contiene conservante senza mercurio

#### 4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette di precisione variabili, calibrati
- Incubatore a 37°C
- Materiale per il lavaggio automatico o manuale
- Agitatore vortex
- Acqua deionizzata o (al momento) distillata
- Cronometro
- Carta assorbente

### 4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kit aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati come descritto sopra.

### 4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

#### **Wash Solution**

Diluire la **Wash Solution 1+19** (p.es. 10 mL + 190 mL) con acqua sterile ridistillata. Il valore pH in base a diluizione è 7,2 ± 0,2.

Consumo: ~ 5 mL per determinazione.

I cristalli nella soluzione si sciolgono durante il riscaldamento a 37 °C in bagnomaria. Assicurarsi che i cristalli siano completamente dissolti prima dell'uso.

La **Wash Solution diluita** è stabile per 4 settimane a 2 °C a 8 °C.

#### 4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza.

#### 4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

### 5 CAMPIONI

Siero o plasma può essere usato per questo test.  
Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

#### 5.1 Collezione dei campioni

##### Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

##### Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

#### 5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 24 ore a 2°C a 8°C prima dell'utilizzo. Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20°C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

#### 5.3 Diluizione dei campioni

Prima dell'utilizzo diluire ogni campione dei pazienti **1 + 100** con il *Sample Diluent*,  
P.es. 10 µL del campione + 1 mL del *Sample Diluent* **agitare bene; lasciare stare per 15 minuti, agitare bene.**

*Campioni con una concentrazione più elevata dello Standard 3 più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.*

*P.es diluizione b): 20 µL della diluizione a) + 180 µL Sample Diluent (agitare bene).*

**Nota bene:** Standard e Controlli sono pronti all'uso e non devono essere diluiti!

## 6 ATTUAZIONE DEL TEST

### 6.1 Indicazioni generali

- **È molto importante portare tutti i reagenti, campioni e controlli a temperatura ambiente prima dell'esecuzione del test!**
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.
- Dopo la prima apertura e il seguente magazzinaggio controllare il tracciante e i controlli per contaminati microbici prima dell'ulteriore uso.
- Per evitare contaminazioni incrociate e risultati falsi pipettare i campioni e il tracciante sul fondo del pozzetto.
- Durante l'incubazione coprire i pozzetti per evitare l'evaporazione.

## 6.2 Esecuzione del test

Prima d' iniziare con il test i **campioni dei pazienti da preparare com'è descritto del punto 5.3, agitare bene** e diluire la *Wash Solution* e si dovrebbe eseguire un piano di distribuzione ed identificazione per tutti i campioni e controlli sul prestampato fornito nel kit.

1. Selezionare il numero richiesto di strips o pozzetti e inserirli sul sostegno.  
Si prega di collocare almeno:
 

1 pozzetto	(p.es. A1)	per il bianco,
1 pozzetto	(p.es. B1)	per il <i>Neg. Control</i> , (Standard 0)
3 pozzetti	(p.es. C1/D1/E1)	per il <i>Standard 1 -3</i> e
1 pozzetto	(p.es. F1)	per il <i>Pos. Control</i>

 È lasciato all'operator di determinare i controlli e i campioni in doppio.
2. Aggiungere
 

<b>100 µL</b> del <i>Neg. Control</i>	nei pozzetto B1
<b>100 µL</b> of <i>Standard 1</i>	nei pozzetto C1
<b>100 µL</b> of <i>Standard 2</i>	nei pozzetto D1
<b>100 µL</b> of <i>Standard 3</i>	nei pozzetto E1
<b>100 µL</b> del <i>Pos. Control</i>	nei pozzetto F1 e

**100 µL** di ogni campione diluito con una nuova punta nei rispettivi pozzetti.  
Lasciare il pozzetto A1 vuoto per il bianco!
3. Coprire i pozzetti con la foglia fornita nel kit. Incubare per **60 minuti a 37°C**.
4. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.  
Lavare i pozzetti 5 volte con *Wash Solution* diluita (**300 µL in ogni pozzetto**). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.  
**Importante:** La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esequimento del lavaggio!
5. Aggiungere **100 µL** del *Enzyme Conjugate* in ogni pozzetto, **eccetto A1**.
6. Incubare per **30 minuti a temperatura ambiente (20°C a 25°C)**.  
*Non esporre alla luce solare diretta!*
7. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.  
Lavare i pozzetti 5 volte con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
8. Aggiungere **100 µL** di *Substrate Solution* in ogni pozzetti.
9. Incubare per **15 minuti esattamente a temperatura ambiente (20°C a 25°C) al buio**.
10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della *Stop Solution* in ogni pozzetto.  
Il colore blu sviluppato vira al giallo.  
**Nota:** Nei campioni fortemente positivi si può formare un precipitato scuro del cromogeno!
11. Determinare la densità ottica a **450/620 nm** con un fotometro **entro 30 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

## 6.3 Misure fotometriche

**Azzerare** lo strumento ELISA per micropiastre utilizzando il **bianco nel pozzetto A1**.

Se per motivi tecnici il fotometro ELISA non puo' essere azzerato utilizzando il bianco nel pozzetto A1, si deve sottrarre l'assorbanza il valore del pozzetto A1 da tutti gli altri valor misurati per ottenere risultati reali!

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e riportare i valori di tutti i campioni e controlli del piano di distribuzione ed identificazione.

Determinazione a doppio raggio usando 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento è raccomandabile.

Dove possibile calcolare il **valore medio die valori di assorbanza** per tutti i campioni in doppio.



## 7 RESULTATI

### 7.1 Convalidazione del test

Il test può essere considerato valido se i seguenti criteri sono realizzati:

<b>Valor bianco in A1:</b>	Assorbanza <b>inferiore a 0.10</b>
<b>Neg. Control in B1:</b>	Assorbanza <b>inferiore a 0.20</b>
<b>Standard 1 (valore limite) in C1:</b>	Valor di assorbanza <b>tra 0.35 - 0.85</b>
<b>Standard 2 in D1:</b>	Valor di assorbanza <b>tra 0.90 - 2.10</b>
<b>Standard 3 in E1:</b>	Valor di assorbanza <b>tra 1.80 - 3.00</b>
<b>Pos. Control in F1:</b>	Valor di assorbanza <b>tra 0.65 - 3.00</b>

### 7.2 Calcolo dei risultati quantitativi

Per ottenere risultati quantitativi in DU/mL, rappresentare graficamente i valori (medi) di assorbanza dei *Neg. Control* (Standard 0) e *Standard 1, 2, e 3* su carta a scala lineare contro le loro corrispondenti concentrazioni (0, 15, 75, 150 DU/mL) e costruire una curva di calibrazione standard (valori di assorbanza sull'ordinata y, concentrazioni sull'ascisse x).

Leggere i risultati per interpolazioni con la curva standard usando i valori (medi) di assorbanza di ciascun campione di paziente e dei controlli.

Tutti i programmi di elaborazione di dati adatti possono essere usati per il calcolo automatico dei risultati quantitativi. Le seguenti formule matematiche possono essere usate: regressione lineare o calcolo punto a punto dalla curva standard.

*NOTA:* Per pazienti con concentrazioni superiori allo standard 3, si deve analizzare una seconda diluizione 1:10 del campione 1+100 del paziente

### 7.3 Interpretazione quantitativa dei risultati.

Valori normali per questo test ELISA dovrebbero essere stabiliti per ogni laboratorio basando sulla propria popolazione di pazienti nelle aree geografiche servite.

I seguenti valori possono essere usati come direttiva:

<b>CUT-OFF</b>	<b>15 DU/mL</b>
<b>POSITIVI:</b>	<b>&gt; 18 DU/mL</b>
<b>ZONA GRIGIA (equivoca):</b>	<b>15 - 18 DU/mL</b>
<b>NEGATIVI:</b>	<b>&lt; 15 DU/mL</b>

### 7.4 Calcolo dei risultati qualitativi

Valori di assorbanza dello **Standard 1 (Cut-off, valore limite) = CO**

Esempio:  $0.56 = CO$

### 7.5 Interpretazione

**POSITIVI** Valori (medi) di assorbanza dei pazienti almeno 20 % sopra il CO  
(Medio  $DO_{\text{paziente}} > 1.2 \times CO$ )

**ZONA GRIGIA** Valori (medi) di assorbanza da CO a 20 % sopra il valore CO  
ripetere il test 2-4 settimane dopo - con nuovi campioni dei pazienti.  
( $CO \leq DO_{\text{medio paziente}} \leq 1.2 \times CO$ )

Risultati del secondo test nuovamente nella zona grigia  $\Rightarrow$  **NEGATIVI**

**NEGATIVI** Valori (medi) di assorbanza inferiore a CO  
(Medio  $DO_{\text{paziente}} < CO$ )

## 8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge.

Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno.

Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

È consigliabile di utilizzare programmi di valutazione di qualità nazionali o internazionali per assicurarsi la precisione dei risultati.

Se i risultati del test non entrano nel campo dei controlli stabiliti, i risultati dei campioni dei pazienti dovrebbero essere considerati invalidi.

In questo caso si prega di controllare i seguenti parametri tecnici: calibrazione delle micropipette e dei cronometri; spettrofotometro, date di scadenze dei reagenti, magazzinaggio e condizione di incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio. Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

### 9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0.014 – 150 DU/mL.

### 9.2 Specificità degli antigeni (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Neg. Control* ed erano 0.014 DU/mL.

### 9.4 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati negativi con l'assenza del reagente analitico.

È 100%. Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.5 Sensitività diagnostica

La sensitività diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati positivi con la presenza del reagente specifico.

È 100%. Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.6 Method Comparison

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.7 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.8 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.9 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 10 LIMITAZIONI

Contaminazioni batteriche o ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei campioni possono influenzare i valori di assorbanza.

Per pazienti immunosoppressi e per neonati i dati sierologici hanno una validità ristretta.

### 10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

## **11 ASPETTI LEGALI**

### **11.1 Affidabilità dei risultati**

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

### **11.2 Conseguenze terapeutiche**

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. La diagnosi di una malattia infettiva non dovrebbe essere fondata sulla base di un solo risultato del test. La diagnosi precisa dovrebbe considerare la storia clinica, la sintomatologia e i dati sierologici. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

### **11.3 Responsabilità legali**











Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.














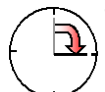


## **12 BIBLIOGRAFIA**

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## SIMBOLOS USADOS CON LOS ELISAS DRG

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	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
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	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
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Pos. Control</i>	Positive Control	Positive Kontrolle	Positif Contrôle	Control positivo	Controllo positivo
<i>Neg. Control</i>	Negative Control	Negative Kontrolle	Négatif Contrôle	Control negativo	Controllo negativo
<i>Cut-off Control</i>	Cut-off Control	Grenzwert-Kontrolle	Valeur limite Contrôle	Control valor limite	Controllo valore limite
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante

## SHORT INSTRUCTIONS FOR USE

	All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) before use.
	Leave well A1 for substrate Blank. Dispense 100 µl of Standards and Control into appropriate wells.
	Dispense 100 µl of sample into selected wells. <b>(Please note special sample treatment, point 5.3!)</b>
	Cover wells with foil. Incubate for <b>60 minutes</b> at 37 °C (room temperature).
	Briskly shake out the contents of the wells.
	Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µl per well).
	Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
	Dispense 100 µl of Enzyme-Conjugate into each well.
	Incubate for <b>30 minutes</b> at room temperature.
	Briskly shake out the contents of the wells.
	Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µl per well).
	Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
	Add 100 µl of Substrate Solution to each well.
	Incubate for <b>15 minutes</b> at room temperature.
	Stop the reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
	Determine the absorbance of each well at 450 nm.