

NovaLisa[®]

Helicobacter pylori IgM

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use / Gebrauchsanweisung / Instrucciones de uso

English	2
Deutsch	7
Español	13
Abbreviations / Abkürzungen / Abreviaciones	22
Packaging materials / Verpackungsmaterialien / Materiales de embalaje	22
Symbols Key / Symbolschlüssel / Símbolos	23
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Resumen de la técnica	24

REF

HELM0220 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The *Helicobacter pylori* IgM ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against *Helicobacter pylori* in human serum or plasma (citrate, heparin) from symptomatic patients or individuals suspected of being infected with *Helicobacter pylori*.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with specific antigen; in resealable aluminium foil.
- **DIL M:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; anti-human IgG (RF Absorbent); coloured green; ready to use; white cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **WASH BUF 20x:** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgM in phosphate buffer (10 mM); coloured red; ready to use; black cap.
- **SUB TMB:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 11.1.

3.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

3.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

4. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

5. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

5.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with specific antigen. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

5.2. WASH BUF 20x

Dilute WASH BUF 20x 1 + 19; e. g. 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL distilled water. The diluted buffer (WASH BUF 1x) is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g., in a water bath. Mix well before dilution.

5.3. **SUB TMB**

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. **SUB TMB** should be colourless or could have a slight blue tinge. If **SUB TMB** turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise, they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

6.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with **DIL M**. Dispense 10 µL sample and 1 mL **DIL M** into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of **WASH BUF 1x** from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of **WASH BUF 1x**. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL **SUB TMB** into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL **SOLN STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for **SUB TMB**, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of **SOLN STOP**.

7.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these instructions for use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

8.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

8.2.1. Results in Units [NTU]

$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Units} = \text{NTU}]$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks.
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.
In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

For further information refer to "S2k-guideline Helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease"; Z Gastroenterol 2016; 54(04): 327-363; DOI: 10.1055/s-0042-102967.

8.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

9.1. Precision

Evaluation of precision of the assay was performed according to "CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014".

9.1.1. Single-Site Study

The precision study was performed at a single site. A negative, a high negative, a low positive, and a moderate positive sample were run in 4 replicates, two times per day for 20 days for a total of 160 results.

Sample	n	Mean (NTU)	Repeatability		Between Run		Within Day		Between Day		Within lab	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderate positive	160	26.22	2.8888	11.0	1.6356	6.2	3.3197	12.7	1.5532	5.9	3.6651	14.0
low positive	160	15.45	1.6646	10.8	1.0262	6.6	1.9555	12.7	2.0899	13.5	2.8621	18.5
high negative	160	8.43	1.2297	14.6	0.6291	7.5	1.3813	16.4	0.6046	7.2	1.5078	17.9
negative	160	4.30	0.6284	14.6	0.3826	8.9	0.7357	17.1	0.2043	4.7	0.7635	17.7

9.1.2. Multisite-Study

The precision study was performed at three different sites. A negative, a high negative, a low positive, and a moderate positive sample were run in 5 replicates, once a day for 5 days for a total of 75 results.

Sample	n	Mean (NTU)	Repeatability		Within Site		Reproducibility	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderate positive	75	22.55	1.9771	8.8	2.4706	11.0	4.4098	19.6
low positive	75	14.98	1.8350	12.2	2.1788	14.5	2.3493	15.7
high negative	75	7.01	1.0202	14.6	1.3413	19.1	1.3580	19.4
negative	75	3.67	0.4682	12.7	0.5336	14.5	0.7613	20.7

9.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 97.06 % (95 % confidence interval: 91.64 % - 99.39 %).

9.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 94.59 % (95 % confidence interval: 81.81 % - 99.34 %).

9.4. Interferences

The assay was evaluated for interferences according to "CLSI. *Interference Testing in Clinical Chemistry*. 3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018". Three samples, one negative, one high negative to equivocal and one positive sample, were spiked with high levels of interferents and were tested along with the unspiked sample. The following table shows the tested substances added to patient samples at the indicated concentrations.

Interferent	Concentration tested
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin, unconjugated	0.4 mg/mL
Bilirubin, conjugated	0.4 mg/mL
Cholesterol	4 mg/mL
Hemoglobin	10 mg/mL
Triglycerides	15 mg/mL

No clinically significant interference effect was found for all tested substances.

9.5. Cross Reactivity

A minimum of 5 samples with antibody activities to potentially cross-reacting parameters (*Adenovirus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, Enterovirus, Respiratory syncytial virus, *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* or samples positive for ANA or rheumatoid factors, and samples from pregnant women were tested to evaluate the cross reactivity of the assay. Positive findings were additionally analyzed with a CE-marked reference assay. The results are shown in the following table.

Samples positive for (antibodies against)	Samples tested	Number of positive samples	
		Helicobacter pylori IgM	CE-marked reference assay
Adenovirus	13	5	1
Antinuclear antibodies (ANA)	14	3	3
<i>Bordetella pertussis</i>	14	5	2
<i>Borrelia burgdorferi</i>	12	4	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	13	4	1
<i>Candida albicans</i>	14	3	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	11	1	0
Enterovirus	15	4	3
Pregnancy samples	12	1	0
Respiratory syncytial virus	12	4	1
Rheumatoid factor (RF)	11	1	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	13	5	3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	15	1	1

Cross-reactions with antibodies against all tested parameters or conditions cannot be excluded.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1).

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337+P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Further information can be found in the safety data sheet

11.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

12. ORDERING INFORMATION

REF	HELM0220	Helicobacter pylori IgM	(96 Determinations)
------------	----------	-------------------------	---------------------

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Helicobacter pylori IgM ELISA dient der qualitativen Bestimmung von Antikörpern der Klasse IgM gegen Helicobacter pylori in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) von symptomatischen Patienten oder Personen mit Verdacht auf eine Infektion mit Helicobacter pylori.

2. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschriff wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit spezifischem Antigen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **DIL M:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; anti-human IgG (RF-Absorbens); grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **WASH BUF 20x:** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe; 0,2 % (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugiertem Antikörper gegen humanes IgM in Phosphatpuffer (10 mM); rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **SUB TMB:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02 % (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 11.1.

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

3.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 – 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

4. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

5.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit spezifischem Antigen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

5.2. WASH BUF 20x

WASH BUF 20x ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL destilliertes Wasser. Der verdünnte Puffer (WASH BUF 1x) ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

5.3. SUB TMB

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. SUB TMB ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte SUB TMB blau sein, ist es kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

6. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

6.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit DIL M verdünnen, z.B. 10 µL Probe und 1 mL DIL M in die entsprechenden Rörchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsanweisung vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf bis zu fünf und das WASH BUF 1x -Volumen von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL WASH BUF 1x waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL SUB TMB in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL SOLN STOP in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe von SUB TMB pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe von SOLN STOP messen.

7.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben notieren.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

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

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **0,200** und < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

8.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: $0,44 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0,42 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0,86: 2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

8.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 NTU	-
Positiv	> 11 NTU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 NTU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen.
Negativ	< 9 NTU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.

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

Für weitere Informationen siehe "S2k-guideline Helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease"; Z Gastroenterol 2016; 54(04): 327-363; DOI: 10.1055/s-0042-102967.

8.3.1. Antikörper Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
IgM	Typisch für Primärantwort Hoher IgM-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgG-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion Selten: → persistierendes IgM
IgG	Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion

9. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

9.1. Präzision

Die Bewertung der Präzision des Assays erfolgte gemäß "CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014".

9.1.1. Single-Site Studie

Die Präzisionsstudie wurde an einem einzigen Standort durchgeführt. Eine negative, eine hoch negative, eine schwach positive und eine moderat positive Probe wurden in 4 Wiederholungen zweimal täglich über einen Zeitraum von 20 Tagen getestet, so dass insgesamt 160 Werte erhalten wurden.

Probe	n	MW (NTU)	Wiederholbarkeit		Reproduzierbarkeit		Innerhalb eines Tages		An verschiedenen Tagen		Innerhalb des Labors	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderat positiv	160	26,22	2,8888	11,0	1,6356	6,2	3,3197	12,7	1,5532	5,9	3,6651	14,0
schwach positiv	160	15,45	1,6646	10,8	1,0262	6,6	1,9555	12,7	2,0899	13,5	2,8621	18,5
hoch negativ - grenzwertig	160	8,43	1,2297	14,6	0,6291	7,5	1,3813	16,4	0,6046	7,2	1,5078	17,9
negativ	160	4,30	0,6284	14,6	0,3826	8,9	0,7357	17,1	0,2043	4,7	0,7635	17,7

9.1.2. Multisite-Studie

Die Präzisionsstudie wurde an drei verschiedenen Standorten durchgeführt. Eine negative, eine hoch negative, eine schwach positive und eine moderat positive Probe wurden in 5 Wiederholungen einmal täglich über 5 Tage hinweg getestet, so dass insgesamt 75 Werte erhalten wurden.

Probe	n	MW (NTU)	Wiederholbarkeit		Innerhalb eines Standortes		Reproduzierbarkeit	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderat positiv	75	22,55	1,9771	8,8	2,4706	11,0	4,4098	19,6
schwach positiv	75	14,98	1,8350	12,2	2,1788	14,5	2,3493	15,7
hoch negativ - grenzwertig	75	7,01	1,0202	14,6	1,3413	19,1	1,3580	19,4
negativ	75	3,67	0,4682	12,7	0,5336	14,5	0,7613	20,7

9.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 97,06 % (95 % Konfidenzintervall: 91,64 % - 99,39 %).

9.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 94,59 % (95 % Konfidenzintervall: 81,81 % - 99,34 %).

9.4. Interferenzen

Der Assay wurde gemäß "CLSI. *Interference Testing in Clinical Chemistry*. 3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018" auf Interferenzen untersucht. Drei Proben, die den relevanten Messbereich abdecken, wurden mit hohen Konzentrationen von Interferenzsubstanzen versetzt und zusammen mit der nicht versetzten Probe getestet. In der folgenden Tabelle sind die getesteten Substanzen aufgeführt, die den Patientenproben in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt wurden.

Interferenzsubstanz	Getestete Konzentration
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin, unkonjugiert	0,4 mg/mL
Bilirubin, konjugiert	0,4 mg/mL
Cholesterin	4 mg/mL
Hämoglobin	10 mg/mL
Triglyceride	15 mg/mL

Für alle getesteten Substanzen wurde keine klinisch signifikante Interferenzwirkung festgestellt.

9.5. Kreuzreaktivität

Mindestens 5 Proben mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter (*Adenovirus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, Enterovirus, Respiratorisches Synzytial-Virus, *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* oder Proben, die positiv auf ANA oder Rheumafaktoren reagieren, sowie Proben von schwangeren Frauen wurden getestet, um die Kreuzreaktivität des Assays zu bewerten. Positive Befunde wurden zusätzlich mit einem CE-gekennzeichneten Referenzassay analysiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Proben positiv für (Antikörper gegen)	Getestete Proben	Anzahl positiver Ergebnisse	
		<i>Helicobacter pylori</i> IgM	CE-gekennzeichneter Referenztest
Adenovirus	13	5	1
Antinukleäre Antikörper (ANA)	14	3	3
<i>Bordetella pertussis</i>	14	5	2
<i>Borrelia burgdorferi</i>	12	4	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	13	4	1
<i>Candida albicans</i>	14	3	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	11	1	0
Enterovirus	15	4	3
Schwangerenproben	12	1	0
Respiratorisches Synzytial-Virus	12	4	1
Rheumafaktor (RF)	11	1	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	13	5	3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	15	1	1

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen alle getesteten Parameter oder Bedingungen können nicht ausgeschlossen werden.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potenziell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 3.1)
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Warning



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen

Die Reagenzien können 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan enthalten (siehe 3.1)
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Warning



H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizungen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

12. BESTELLINFORMATIONEN

REF

HELM0220

Helicobacter pylori IgM

(96 Bestimmungen)

ESPAÑOL

1. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático Helicobacter pylori IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Helicobacter pylori en suero o plasma (citrato, heparina) humano de pacientes sintomáticos o individuos sospechosos de estar infectados con Helicobacter pylori.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualiza añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígeno específico, en bolsa de aluminio.
- **DIL M:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; anti-humana IgG (RF Absorbente); color verde; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **WASH BUF 20x:** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca, 0,2 % (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **SUB TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; ≤ 0,02 % (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; ≤ 0,02 % (v/v) MIT.
- **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado ; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3 :1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 11.1.

3.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

3.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático de Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

5.1. Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con antígeno específico. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

5.2. **WASH | BUF | 20x**

Diluir **WASH | BUF | 20x** 1+19; por ejemplo 10 mL **WASH | BUF | 20x** + 190 mL de agua destilada. El Tampón diluido (**WASH | BUF | 1x**) es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

5.3. **SUB | TMB**

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. **SUB | TMB** debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si **SUB | TMB** se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

6. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

6.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el **DIL | M**, p. E. 10 µL de la muestra con 1 mL de **DIL | M**, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

7. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de **WASH | BUF | 1x** de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 11. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado). Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h ± 5 min a 37 ± 1°C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL **WASH | BUF | 1x**. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: ¡El lavado es muy importante! ¡Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetar 100 µL de **SUB | TMB** en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de **SOLN | STOP** en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el **SUB | TMB**, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir **SOLN | STOP**.

7.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA al cero utilizando el **Blanco**.

¡Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

8.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < 0,100
- **Control Negativo:** valor de la extinción < 0,200 y < Cut-off
- **Control Cut-off:** valor de la extinción 0,150 – 1,300
- **Control Positivo:** valor de la extinción > Cut-off

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

8.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control Cut-off} + 0,44 \text{ OD Control Cut-off} = 0,86:2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

8.2.1. Resultados en unidades [NTU]

$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-unidades} = \text{NTU}]$

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas.
Negativo	< 9 NTU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

Para mayor información, consultar "S2k-guideline Helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease"; Z Gastroenterol 2016; 54(04): 327-363; DOI: 10.1055/s-0042-102967.

8.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

Serología	Significado
IgM	Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda Raras: → persistente IgM
IgG	Característica de la respuesta secundario del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

9.1. Precisión

Se ha realizado la evaluación de la precisión del ensayo de acuerdo con "CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014".

9.1.1. Estudio en un único sitio

El estudio de precisión se realizó en un solo sitio. Una muestra negativa, una altamente negativa, una levemente positiva y una moderadamente positiva fueron analizadas en 4 réplicas, dos veces al día durante 20 días para un total de 160 resultados.

Muestra	n	Promedio (NTU)	Repetibilidad		Variación intracorrida		Variación en un día		Variación intracorrida		Variación dentro del laboratorio	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderadamente positiva	160	26,22	2,8888	11,0	1,6356	6,2	3,3197	12,7	1,5532	5,9	3,6651	14,0
levemente positiva	160	15,45	1,6646	10,8	1,0262	6,6	1,9555	12,7	2,0899	13,5	2,8621	18,5
altamente negativa	160	8,43	1,2297	14,6	0,6291	7,5	1,3813	16,4	0,6046	7,2	1,5078	17,9
negativa	160	4,30	0,6284	14,6	0,3826	8,9	0,7357	17,1	0,2043	4,7	0,7635	17,7

9.1.2. Estudio en multisitio

El estudio de precisión se realizó en tres sitios diferentes. Una muestra negativa, una altamente negativa, una levemente positiva y una moderadamente positiva fueron analizadas en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días para un total de 75 resultados.

Muestra	n	Promedio (NTU)	Repetibilidad		En el mismo sitio		Reproducibilidad	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
moderadamente positiva	75	22,55	1,9771	8,8	2,4706	11,0	4,4098	19,6
levemente positiva	75	14,98	1,8350	12,2	2,1788	14,5	2,3493	15,7
altamente negativa	75	7,01	1,0202	14,6	1,3413	19,1	1,3580	19,4
negativa	75	3,67	0,4682	12,7	0,5336	14,5	0,7613	20,7

9.2. Especificad Diagnóstica

La especificidad diagnóstica se define como la probabilidad del ensayo de dar negativo en ausencia del analito específico. Es del 97,06 % (95 % Intervalo de confianza: 91,64 % - 99,39 %).

9.3. Sensibilidad de Diagnóstico

La sensibilidad diagnóstica se define como la probabilidad del ensayo de dar positivo en presencia del analito específico. Es del 94,59 % (95 % Intervalo de confianza: 81,81 % - 99,34 %).

9.4. Interferencias

El ensayo se evaluó para detectar interferencias de acuerdo con "CLSI. *Interference Testing in Clinical Chemistry*. 3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018". Tres muestras, una negativa, una altamente negativa a equívoca y una muestra positiva, fueron adicionadas con altos niveles de interferentes y se analizaron junto con la muestra no adicionada. La siguiente tabla muestra las sustancias analizadas añadidas a las muestras de los pacientes en las concentraciones indicadas.

Interferente	Concentración analizada
Albúmina	60 mg/mL
Bilirubina, no conjugada	0,4 mg/mL
Bilirubina, conjugada	0,4 mg/mL
Colesterol	4 mg/mL
Hemoglobina	10 mg/mL
Triglicéridos	15 mg/mL

No se encontró ningún efecto de interferencia clínicamente significativo para todas las sustancias probadas.

9.5. Reactividad cruzada

Para evaluar la reactividad cruzada del ensayo se analizaron un mínimo de 5 muestras con actividades de anticuerpos frente a parámetros potencialmente reactivos cruzados (*Adenovirus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, Enterovirus, Virus respiratorio sincitial, *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* o muestras positivas para ANA o factores reumatoides, y muestras de mujeres embarazadas). Los resultados positivos se analizaron adicionalmente con un ensayo de referencia con marcado CE. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Muestras positivas para (anticuerpos contra)	Muestras analizadas	Número de muestras positivas	
		Helicobacter pylori IgM	Ensayo de referencia con marcado CE
Adenovirus	13	5	1
Anticuerpos antinucleares (ANA)	14	3	3
<i>Bordetella pertussis</i>	14	5	2
<i>Borrelia burgdorferi</i>	12	4	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	13	4	1
<i>Candida albicans</i>	14	3	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	11	1	0
Enterovirus	15	4	3
Muestras de mujeres embarazadas	12	1	0
Virus respiratorio incitial	12	4	1
Factores reumatoides	11	1	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	13	5	3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	15	1	1

No pueden excluirse reacciones cruzadas con anticuerpos contra todos los parámetros o condiciones analizados.

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales di origen humana o animal deveram ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

11.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 3.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Los reactivos pueden contener 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (consulte el cap. 3.1).

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H315	Provoca irritación cutánea.
H319	Provoca irritación ocular grave.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
P337+P313	Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

11.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con las empresas de gestión de residuos, que le asesorarán sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.


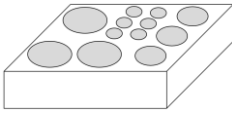




12. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

REF	HELM0220	Helicobacter pylori IgM	(96 determinaciones)
-----	----------	-------------------------	----------------------






ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABREVIACIONES

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATERIALES DE EMBALAJE

 <p>PAP 21</p>	 <p>PAP 21</p>	 <p>PAP 22</p>
<p>SOLN STOP WASH BUF 20x SUB TMB DIL M</p> <p>CONJ CONTROL + CONTROL - CUT OFF</p>		<p>MTP</p>
 <p>HDPE 2</p>	 <p>PP 5</p>	 <p>PET / ALU / LDPE 90</p>

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / <i>In-vitro</i> -Diagnostikum / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Fecha de caducidad
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Temperatura de almacenamiento
CE	CE marking / CE-Kennzeichnung / Marca CE
UDI	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identificación única del producto
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Placa de Microtitulaci3n
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugado
CONTROL -	Negative Control / Negativkontrolle / Control Negativo
CONTROL +	Positive Control / Positivkontrolle / Control Positivo
CUT OFF	Cut-off Control / Cut-off Kontrolle/ Control Cut-off
DIL M	IgM Sample Dilution Buffer / IgM Probenverdünnungspuffer / Tamp3n de Diluci3n de Muestras IgM
SOLN STOP	Stop Solution / Stoppl3sung / Soluci3n de Parada
SUB TMB	TMB Substrate Solution / TMB-Substratl3sung / Soluci3n Substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampone di Lavaggio concentrato x20
WASH BUF 1x	20-fold dilution of WASH BUF 20x Working solution/ 20-fach Verdünnung von WASH BUF 20x Arbeitsl3sung/Diluci3n de 20 veces del WASH BUF 20x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Helicobacter pylori IgM

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x					
SUB TMB	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark					
SOLN STOP	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

HELM0220_IFU_rev01_fromLot_007N