

# CagA IgG

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for  
the quantitative/qualitative  
determination of IgG antibodies  
to Helicobacter pylori  
cytotoxin associated gene A antigen  
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



**DIA.PRO**

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

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

## CagA IgG

### A. INTENDED USE

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of IgG antibodies to Helicobacter pylori cytotoxin associated gene A Antigen or CagA-Ag in sera/plasma.

The product is intended for the follow-up of patients showing gastrointestinal pathologies referable to H.pylori infection.

For "in vitro" diagnostic use only.

### B. INTRODUCTION

Helicobacter pylori (Hp) is a Gram negative bacterium, firstly isolated in gastric mucosa by Marshall and Warren in 1983.

Hp has been recognized to be the agent responsible of most of cases of gastric mucosal damage and to play a role in the evolution of gastric diseases to carcinoma.

Recently, virulent strains have been observed showing a high molecular weight cytotoxin, constituted by 87 KDa monomers causing the vacuolation of the epithelial cells (VacA toxin) and severe damages to the gastric mucosa.

A protein associated to VacA, produced in strains bearing the related gene and showing a molecular weight of 128 KDa has been also observed. This protein named CagA-Ag is immunogenic and stimulate the patient to produce specific antibodies, both of IgG and IgA classes.

Their reactivity in the patient is considered a clinical sign of presence of an highly virulent strain of H.pylori and, for IgA, of an acute ongoing infection.

### C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with Helicobacter pylori specific CagA-Ag synthetic antigen.

In the 1<sup>st</sup> incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti CagA-Ag IgG are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the 2<sup>nd</sup> incubation bound anti CagA-Ag IgG are detected by the addition of anti hIgG antibody, labeled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti CagA-Ag IgG antibodies present in the sample.

IgG in the sample may be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (Uarb/ml) as no international standard is available.

### D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

#### 1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with synthetic CagA-Ag. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

#### 2. Calibration Curve: CAL N° ...

Ready to use and color coded standard curve ranging:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml  
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml  
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml  
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml  
2 ml CAL 5 = 50 arbU/ml  
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue color coded.

#### 3. Control Serum: CONTROL ...ml

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

#### 4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

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

#### 5. Enzyme conjugate: CONJ

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

#### 6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine (or TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

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

#### 7. Sulphuric Acid: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.

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

#### 8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

#### 9. Plate sealing foils n°2

#### 10. Package insert n°1

### E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000, 100 and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet) set at +37°C (+/-0.5°C tolerance).
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

### F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for

Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 3 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

#### G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection.

Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

#### H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

##### Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

##### Calibration Curve

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

##### Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

**Note:** The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

##### Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

**Note:** Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

##### Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

##### Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

##### Sample Diluent

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

##### Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

**Warning H statements:**

**H315** – Causes skin irritation.

**H319** – Causes serious eye irritation.

**Precautionary P statements:**

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

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

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

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

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

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

**I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT**

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/- 0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).  
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data

handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

**L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS**

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Control Serum as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

**M. ASSAY PROCEDURE**

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

**M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:**

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.

- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
- Then dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

**Important note:** Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

**Important note:** Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

## M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

- Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
- Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 5 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

**Important note:** Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

**Important note:** Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

### General Important notes:

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

## N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control(*)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
<b>1<sup>st</sup> incubation</b>	<b>60 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
<b>2<sup>nd</sup> incubation</b>	<b>60 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl
<b>3<sup>rd</sup> incubation</b>	<b>20 min</b>
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-630nm

### (\*) Important Notes:

- The Control Serum (CS) it does not affect the test's results calculation.
- The Control Serum (CS) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

### Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1									
B	BLK	CAL4	S 2									
C	CAL1	CAL5	S 3									
D	CAL1	CAL5	S 4									
E	CAL2	CAL6	S 5									
F	CAL2	CAL6	S 6									
G	CAL3	CS(*)	S 7									
H	CAL3	CS(*)	S 8									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator  
 S = Sample CS(\*) = Control Serum- Not mandatory  
 An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

### Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11									
B	CAL1	S 4	S 12									
C	CAL1	S 5	S 13									
D	CAL2	S 6	S 14									
E	CAL2	S 7	S 15									
F	CAL6	S 8	S 16									
G	S1	S 9	S 17									
H	S2	S 10	S 18									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators  
 S = Sample

### O. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm after blanking  coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

CAL 2 5 arbU/ml  OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml  < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

### \*\* Note:

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	Mean OD450nm CAL4 ± 20%

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Control Serum  Different from Expected value	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, CAL1, CAL2, CAL 6), match the established requirements, the test may be considered valid.

### Important note:

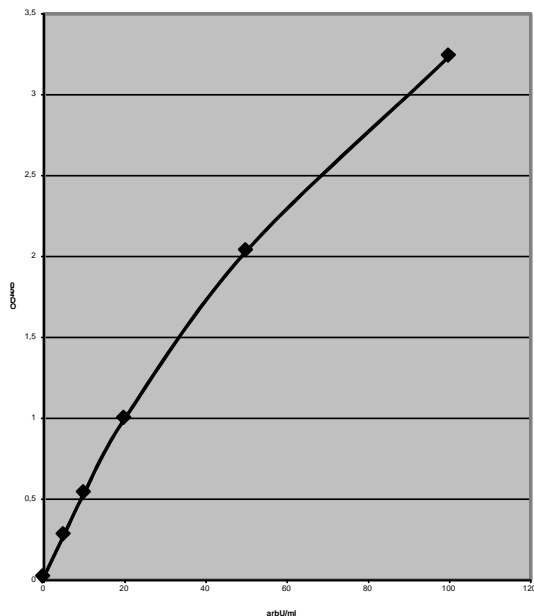
*The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.*

## P. RESULTS

### P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested). Then on the calibration curve calculate the concentration of anti CagA-Ag IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



**Important Note:**

Do not use the calibration curve above to make calculations.

**P.2 Qualitative method**

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

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 11):

**Note:** The following data must not be used instead or real figures obtained by the user.

Calibrator 0 arbu/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm  
 Mean Value: 0.022 OD450nm  
 Lower than 0.150 – Accepted

Calibrator 5 arbu/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm  
 Mean Value: 0.260 OD450nm  
 Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted

Calibrator 100 arbu/ml: 2.045 OD450nm  
 Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm/620-630nm of the Calibrator 5 arbu/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

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

**Q. INTERPRETATION OF RESULTS**

Samples with a concentration lower than 5 arbu/ml are considered negative for anti CagA-Ag IgG antibody. Samples with a concentration higher than 5 arbu/ml are considered positive for anti CagA-Ag IgG antibody.

**Important notes:**

1. *H.pylori* CagA-Ag IgG results alone are not enough to provide a clear diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Other tests for *Helicobacter pylori* (supplied by Dia.Pro

*Diagnostic BioProbes s.r.l. at code n° HPAG.CE, HPA.CE, HPG.CE and HPM.CE), should be carried out.*

2. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
3. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

**R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples in an external laboratory with reference to a FDA approved reference kit.

**1. Limit of detection**

No international standard for CagA-Ag IgG Antibody detection has been defined so far by the European Community. In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past HP infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

**2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:**

The diagnostic performances were evaluated on samples supplied by an external center, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with the reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients with a clinical history of *H.pylori* infection.

The diagnostic specificity was determined on panels of more than 100 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity. No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

**3. Reproducibility:**

A study conducted on three samples of different anti CagA-Ag IgG reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs has shown CV% values ranging 4-20% depending on the OD450nm/620-630nm readings.

The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.

**S. LIMITATIONS**

False positivity has been assessed as less than 2% of the normal population.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates may generate false positive results.

## REFERENCES

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.
9. Warren J.R. et al.. Lancet (1983), 45, 1273-1275
10. Goodwin C.S. et al.. Int.Syst.Bacteriol. (1989), 39, 397-405
11. Blaser M.J. et al.. Gastroenterology (1987), 93, 371-383
12. Dooley C.P. eta al.. N.Engl.J.Med. (1989), 321, 1562-1566
13. Parsonnet J. Et al.. N.Engl.J.Med. (1991), 325, 1127-1131
14. Leying H. et al.. Mol.Microbiol. (1992), 6, 2863-2874
15. Perez-Perez G.I. et al.. Infect.Immun. (1992), 60, 3658-3663
16. Cover T.L. et al.. J.Biol.Chem. (1992), 267, 10570-10575
17. Lenuk R.D. et al.. Rev.Infect.Dis. (1991), 13, 5685-5689
18. Crabtree J.E. et al.. J.Clin.Pathol. (1992), 45, 733-734
19. Cover T.L. et al.. Infect.Immun. (1990), 58, 603-610
20. Gerstenecker B. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol. (1992), 11, 595-601
21. Cussac V. et al.. J.Bacteriol. (1992), 174, 2466-2473

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

Manufacturer:  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy









# CagA IgG

**Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgG para la citotoxina de *Helicobacter pylori* asociada al antígeno A en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro”-



**DIA.PRO**

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

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

## CagA IgG

### A. OBJETIVO DEL ESTUCHE

Ensayo Inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG para la citotoxina de *Helicobacter pylori* asociada al antígeno gen A o CagA-Ag en suero/plasma humanos.

El producto ha sido diseñado para el seguimiento de pacientes que muestran patologías intestinales atribuidas a la infección por *H.pylori*.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

### B. INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* (Hp) es una bacteria Gram negativa, aislada por primera vez en la mucosa gástrica por Marshall y Warren en 1983.

Hp ha sido reconocido por ser el agente responsable de la mayoría de los casos de daño en la mucosa gástrica y juega un papel en la evolución de la enfermedad gástrica hacia el carcinoma.

Recientemente, se han observado cepas virulentas que muestran una citotoxina de alto peso molecular, constituida por monómeros de 87 KDa causando la vacuolización de las células epiteliales (toxina VacA) y daños severos en la mucosa gástrica.

Una proteína de 128 KDa asociada a VacA se ha observado en cepas relacionadas.

Esta proteína llamada CagA-Ag es inmunógena y estimula al paciente a producir anticuerpos específicos, de las clases IgG e IgA.

Su reactividad en el paciente es considerada como un signo clínico de la presencia de una cepa de alta virulencia de *H.pylori* y, para IgA, cursa con una infección aguda.

### C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con el antígeno sintético específico CagA-Ag de *Helicobacter pylori*.

En la primera incubación, se añade la muestra diluida y los anticuerpos IgG anti-CagA-Ag, son capturados por los antígenos de la fase sólida.

Después de lavar los demás componentes de la muestra, en la segunda incubación los anticuerpos IgG contra CagA-Ag son detectados mediante la adición de anticuerpos anti-IgG, conjugados con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-CagA-Ag presentes en la muestra.

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

### D. COMPONENTES

Cada estuche contiene los reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

#### 1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con CagA-Ag sintético. Las placas están empacadas en bolsas selladas con desecante. Dejar la microplaca hasta alcanzar la temperatura de la habitación antes de abrir; no usar las tiras en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

#### 2. Curva de calibrado: CAL N°...

Listo para usar. La curva estándar codificada por color se encuentra en un rango:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml  
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml  
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml  
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml  
2 ml CAL 5 = 50 arbU/ml  
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Los estándares están calibrados según un interno Gold Estándar o IGS ya que no se ha definido uno internacional. Contiene proteínas de suero humano, 2% de caseína, 10 mM de tampón Na-citrato pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azida y 0.045% ProClin 300 como preservativos. Los estándares están codificados por el color azul.

#### 3. Control del Suero: CONTROL ...ml

1 vial. Liofilizado. Contiene proteínas de suero fetal bovino, anticuerpos IgG humanos para CagA-Ag con 20 arbU/ml, 0.3 mg/ml de sulfato de gentamicina y 0.045% de ProClin 300 como preservativos.

#### 4. Tampón de lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella20x solución concentrada.

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

#### 5. Conjugado: CONJ

1x16ml/vial. Listo para usar y codificado en color rojo. Contiene peroxidasa conjugada con anticuerpos IgA policlonales humanos, 5% BSA, 10 mM tampón Tris pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 y 0.02% sulfato de gentamicina como preservativos.

#### 6. Cromógeno/Sustrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene 50 mM de tampón fosfato-citrato pH 3.5-3.8, 4% de dimetilsulfóxido, 0,03% de tetra-metil-benzidina (o TMB) y 0,02% de peróxido de hidrógeno (o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

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

#### 7. Ácido Sulfúrico: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene 0.3 M de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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

#### 8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60ml/vial. Contiene un 2% de caseína, 10 mM de tampón Na-citrato pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azida y 0.045% ProClin 300 como preservativos. Se usa para diluir las muestras.

#### 9. Sellador adhesivo n°2

#### 10. Manual de instrucciones

### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas Calibradas (1000, 100 y 10 µL) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. *Timer* con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) a 37°C.
6. Lector calibrado de microplacas ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vortex o similar.

## F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

## G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

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

## H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

### Microplaca:

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

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

### Curva de Calibrado

Lista para usar. Mezclar cuidadosamente en vortex antes de usar.

### Suero Control

Añadir el volumen de agua de ELISA indicada en la etiqueta. Mezclar bien con el vortex antes de usar.

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

### Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada fino a 1200 ml y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

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

### Conjugado:

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

el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

**Cromógeno/ Substrato:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

**Diluyente de muestras**

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

**ÁCIDO SULFÚRICO:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

**H315** – Provoca irritación cutánea.

**H319** – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

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

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

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

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

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

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

**I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL ESTUCHE**

- Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del estuche.
- La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de

lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

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

**L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO**

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

13. En caso de que surja algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

#### M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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

El estuche puede utilizarse para determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

#### M1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

1. Diluir las muestras en un tubo en una proporción 1:101 (por ejemplo: 1000 µl muestra diluida + 10 µl muestra). No diluir, el juego de calibración así como los calibradores están ya listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vortex y proceder como se ha descrito anteriormente.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte. Dejar vacíos los pocillos A1 y B1 para el blanco.
3. Dispensar 100 µl de los Calibradores y 100 µl de Control de Suero por duplicado. Dispensar 100 µl de muestra diluida en cada pocillo debidamente identificado.
4. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.

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

5. Lavar la microplaca con el lavador automático dispensado (sección 1.3)
6. Dispensar 100 µl del Conjugado en cada pocillo, excepto en A1+B1 que son los pocillos del blanco, y tapar con el precinto. Comprobar que este componente de color rojo ha sido añadido a todos los pocillos, excepto a A1 y B1.

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

7. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.
8. Lavar la microplaca como en el paso 5.
9. Dispensar 100 µl de la mezcla Cromógeno/Sustrato en cada pocillo, los pocillos de blanco A1 y B1 incluidos. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

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

10. Dispensar 100 µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para parar la reacción enzimática usando la misma secuencia de dispensación del paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del Control Positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
11. Medir la intensidad de color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección 1.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (eliminación de fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 o B1 o ambos.

#### M2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Si sólo se requiere una determinación cualitativa, proceder según se detalla a continuación.

1. Diluir las muestras en un tubo en una proporción 1:101 (por ejemplo: 1000 µl muestra diluida + 10 µl muestra). No diluir, el juego de calibración así como los calibradores están ya listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vortex y proceder como se ha descrito anteriormente.

2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte. Dejar vacíos los pocillos A1 y B1 para el blanco.
3. Dispensar 100 µl del Calibrador de 0 arb/ml y del Calibrador de 5 arb/ml por duplicado y del Calibrador de 100 arb/ml sólo una vez. Dispensar 100 µl de las muestras diluidas en cada pocillo debidamente identificado.
4. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.

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

5. Lavar la microplaca con el lavador automático dispensado (sección 1.3)
6. Dispensar 100 µl de Conjugado de Enzima a cada pocillo, excepto en el pocillo A1, y tapar con el precinto. Comprobar que este componente de color rojo ha sido dispensado en todos los pocillos, excepto en el A1.

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

7. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.
8. Lavar los pocillos como en el paso 5.
9. Dispensar 100 µl de la mezcla Cromógeno/Sustrato en cada pocillo, el pocillo del blanco incluido. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

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

10. Dispensar 100 µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos usando la misma secuencia de dispensación del paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del Control Positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
11. Medir la intensidad de color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección 1.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (eliminación de fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1.

#### Notas generales importantes:

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

#### N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Calibradores y Control(*)	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl

<b>3<sup>o</sup> incubación</b>	<b>20 min</b>
Temperatura	r.t.
Ácido Sulfúrico	100 ul
Lectura DO	450nm/620-630nm

**(\*) Notas importantes:**

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

A continuación se muestra un ejemplo del esquema de dispensación para el Análisis Cuantitativo.

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M 1									
B	BL	CAL4	M 2									
C	CAL1	CAL5	M 3									
D	CAL1	CAL5	M 4									
E	CAL2	CAL6	M 5									
F	CAL2	CAL6	M 6									
G	CAL3	CS(*)	M 7									
H	CAL3	CS(*)	M 8									

Leyenda: BL = Blanco CAL = Calibrador  
CS(\*) = Control del Suero - No obligatorio M = Muestra

A continuación se muestra un ejemplo del esquema de dispensación para el ensayo Cuantitativo.

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M3	M 11									
B	CAL1	M 4	M 12									
C	CAL1	M 5	M 13									
D	CAL2	M 6	M14									
E	CAL2	M 7	M 15									
F	CAL6	M 8	M16									
G	M1	M 9	M17									
H	M2	M 10	M 18									

Leyenda: BL = Blanco CAL = Calibrador  
M = Muestra

**O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO**

La validación de los parámetros se realizará con los calibradores al mismo tiempo que se esté utilizando el estuche para verificar que la realización del ensayo es la esperada.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Requerimientos
Pocillo Blanco	Valor < 0.100 DO450nm
CAL 1 0 arbU/ml	Valor después del blanco < 0.150 DO450nm Coeficiente de variación < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	DO450nm > DO450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	DO450nm > 1.000

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
<b>Pocillo blanco</b> > 0.100 DO450nm	1. que la solución Cromógeno/Sustrato no se ha contaminado durante el ensayo.
<b>CAL 1</b> <b>0 arbU/ml</b> > 0.150 OD450nm después del blanco  coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo) 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
<b>CAL 2</b> <b>5 arbU/ml</b>  OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
<b>CAL 6</b> <b>100 arbU/ml</b>  < 1.000 OD450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

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

**\*\* Notas**

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

Parámetro	Exigencia
Suero Control	valor medio de DO450nm CAL4 ± 20%

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



Problema	Compruebe que
<b>Suero Control</b> Diferente de establecidos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. el procedimiento ha sido realizado correctamente.</li> <li>2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada).</li> <li>3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación.</li> <li>4. no ha ocurrido contaminación externa del suero.</li> </ol>

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

**Nota importante:**

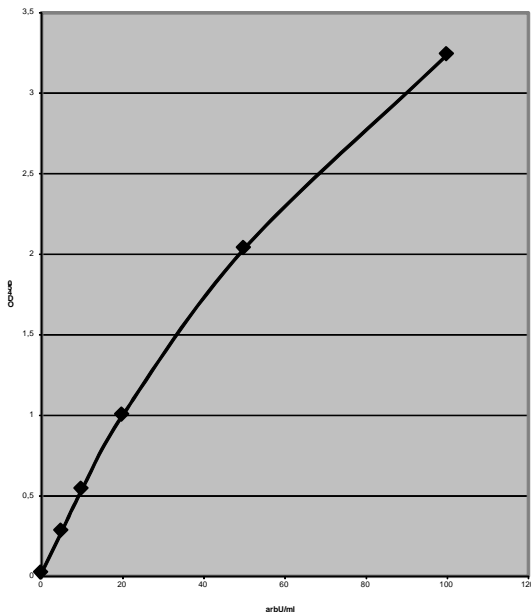
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

**P. RESULTADOS**

**P.1 Método cuantitativo**

Si el ensayo resulta que es válido, usar para el método cuantitativo un programa adecuado de ajuste para dibujar la curva de calibrado a partir de los valores obtenidos en la lectura a 450nm/620-630nm (se recomienda interpolar 4 parámetros). Calcular sobre la curva de calibrado la concentración de anticuerpo IgG anti-CagA-Ag en las muestras.

A continuación se muestra un ejemplo de la curva de Calibrado.



**Nota importante:**

No usar esta curva de calibración para hacer cálculos.

**P.2 Método Cualitativo**

En el método cualitativo, calcular la media de los valores de DO450nm para los Calibradores 0 y 5 arbU/ml y comprobar que el ensayo es válido.

Ejemplo del cálculo (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11).

**Nota:** Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Calibrador 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm  
 Valor Medio: 0.022 OD450nm  
 Menor de 0.150 – Válido

Calibrador 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm  
 Valor Medio: 0.260 OD450nm  
 Mayor de Cal 0 + 0.100 – Válido

Calibrador 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm  
 Mayor de 1.000 – Válido

La DO450nm/620-630nm del Calibrador de 5 arb/ml es considerada el valor de corte (cut-off o Co).

La relación entre el valor de DO450nm/620-630nm de la muestra y la DO450nm/620-630nm del Calibrador 5 arbU/ml (o M/Co) pueden proporcionar una estimación semi-cuantitativa del contenido específico de IgG anti CagA-Ag en la muestra.

**Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Las muestras con una concentración menor de 5 arbU/ml son consideradas negativas para el anticuerpo IgG anti CagA-Ag.

Las muestras con una concentración superior a 5 arbU/ml son consideradas como positivas para el anticuerpo IgG anti CagA-Ag.

**Notas importantes:**

1. La IgG CagA-Ag de *H.pylori sola* no es suficiente para proporcionar un claro diagnóstico para la infección por *Helicobacter pylori* (suministrado por Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. con código n° HPAG.CE, HPA.CE, HPG.CE and HPM.CE), podrán ser llevados a cabo.
2. La interpretación de los resultados debe realizarse bajo la supervisión del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y malas interpretaciones.
3. Cuando los resultados de los ensayos son transmitidos del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico ha sido hecho y comunicado al paciente por el médico de adecuada cualificación.

**R. CARACTERÍSTICAS DE REALIZACIÓN**

La Evaluación y Realización han sido dirigidos en paneles de muestras positivas y negativas en un laboratorio clínico externo con relación a la aprobación del estuche por parte de la FDA.

**1. Límite de detección**

La detección estándar no internacional del Anticuerpo IgG CagA-Ag determinada hasta aquí por la Comunidad Europea. En esta ausencia, la Internal Gold Standard (o IGS), derivado de un paciente con una historia de infección por HP, ha sido definido para proporcionar un derivado con una excelente y constante sensibilidad.

**2. Especificidad y sensibilidad diagnósticas**

El diagnóstico realizado fue evaluado en muestras suministradas por un centro externo, con una gran experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La sensibilidad del diagnóstico fue estudiada en más de 50 muestras, previamente ensayadas como positivas con el estuche de referencia de origen europeo que se usa en el laboratorio. Las muestras positivas fueron recogidas de pacientes con una historia médica de infección por *H.pylori*.

El diagnóstico de la especificidad se determinó en paneles de más de 100 muestras negativas de individuos normales y donantes de sangre, clasificados como negativos con el estuche de referencia, incluyendo especímenes que pudieran interferir potencialmente.

Tanto el plasma, preparado con diferentes técnicas estándar de preparación (citrato, EDTA y heparina), como el suero han sido usados para determinar la especificidad. No se ha observado una falsa reactividad debido al método o la preparación de las muestras.

La congelación de las muestras también ha sido comprobada para comprobar si las muestras congeladas interfieren en la realización del ensayo. No se observaron interferencias.

La realización de la Evaluación proporciona los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

### 3. Reproducibilidad:

Un estudio realizado con tres muestras de IgG con diferente reactividad anti CagA-Ag, el examen de 16 réplicas en tres rondas diferentes ha mostrado un valor del CV% de 4-20% dependiendo de las lecturas de DO450nm/620-630nm.

La variabilidad mostrada en las tablas no resultó en una mala clasificación.

### S. LIMITACIONES

Los falsos positivos fueron estimados como menos de 2% de la población normal.

Las muestras que tras ser congeladas presentan partículas de fibrina o agregados podrían generar resultados falsos positivos.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.
9. Warren J.R. et al.. Lancet (1983), 45, 1273-1275
10. Goodwin C.S. et al.. Int.Syst.Bacteriol. (1989), 39, 397-405
11. Blaser M.J. et al.. Gastroenterology (1987), 93, 371-383
12. Dooley C.P. eta al.. N.Engl.J.Med. (1989), 321, 1562-1566
13. Parsonnet J. Et al.. N.Engl.J.Med. (1991), 325, 1127-1131
14. Leying H. et al.. Mol.Microbiol. (1992), 6, 2863-2874
15. Perez-Perez G.I. et al.. Infect.Immun. (1992), 60, 3658-3663
16. Cover T.L. et al.. J.Biol.Chem. (1992), 267, 10570-10575
17. Lenuk R.D. et al.. Rev.Infect.Dis. (1991), 13, 5685-5689
18. Crabtree J.E. et al.. J.Clin.Pathol. (1992), 45, 733-734
19. Cover T.L. et al.. Infect.Immun. (1990), 58, 603-610
20. Gerstenecker B. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol. (1992), 11, 595-601
21. Cussac V. et al.. J.Bacteriol. (1992), 174, 2466-2473

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

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





