
CERTEST

H. pylori+
Transferrin

ONE STEP *H. pylori*+Transferrin
COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.





CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest *H. pylori*+Transferrin one step combo card test is a colored chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *H. pylori* and transferrin in stool samples.

CerTest *H. pylori*+Transferrin combo card test offers a simple, a highly sensitive and non-invasive screening assay to determine, on the one hand, the presence of *H. pylori* that causes gastric and duodenal ulcers and on the other, the presence of gastrointestinal bleeding and moreover, to monitor patients treatment (*H. pylori* eradication).

INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a spiral-shaped bacterium that is found in the gastric mucous layer or adherent to the epithelial lining of the stomach. *H. pylori* causes more than 90% of duodenal ulcers and up to 80% of gastric ulcers. The importance of *Helicobacter pylori* testing has increased due to the strong correlation between the presence of bacteria and confirmed gastrointestinal diseases (stomach and duodenum) like gastritis, peptic ulcer disease and gastric carcinoma. Patients suffering from gastro-duodenal ulcer may develop complications such as upper gastrointestinal bleeding or perforation. A precise diagnosis of *H. pylori* after eradication reduces significantly the risk of ulcer reactivation, and thus prevents new episodes of upper gastrointestinal bleeding. The invasive and non-invasive methods are used for diagnosis of infection with *H. pylori* in patients with symptoms of gastrointestinal disease.

Transferrin is a blood-derived component. In gastrointestinal bleeding diseases, it may be leaked into gastrointestinal tract and then discharged with the faeces. Transferrin is stable in faeces and a good marker to detect gastrointestinal bleeding.

This immunochromatographic assay detects simultaneously *H. pylori* and human transferrin in stool samples, obtaining more accurate testing results regarding the *H. pylori* infection.

TEST PRINCIPLE

CerTest *H. pylori*+Transferrin is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *H. pylori* and human transferrin in stool samples.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *H. pylori* and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*H. pylori*) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against human transferrin and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-human transferrin) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

If the sample is *H. pylori* positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*H. pylori* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is human transferrin positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-human transferrin monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip B, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-*H. pylori* antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-human transferrin antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no *H. pylori* and human transferrin presence and yet, the *H. pylori* and human transferrin may be present in a concentration lower than the detection limit and the cut-off value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-*H. pylori* and the anti-human transferrin antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control green-conjugate complex and both control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.




PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provided in the kit are approved for use in the CerTest *H. pylori*+Transferrin test. Do not use any other commercial kit component.
- The presence of yellow lines in the results window (control line zone and test line zone), before using the test, is completely normal and does not imply failure of the test functionality.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

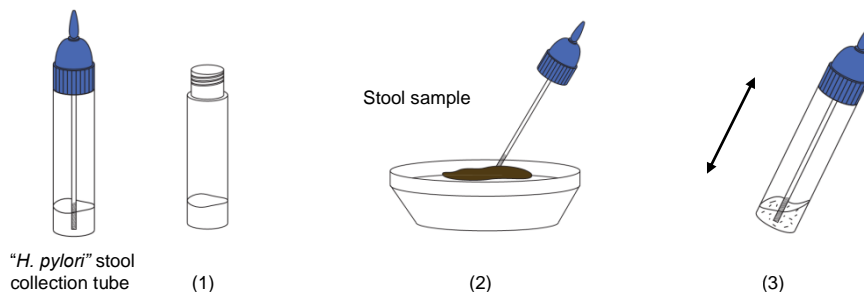
Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8 °C) for 1-2 days prior to testing. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

Please take note that there are two different stool collection tubes.

- a. “*H. pylori*” stool collection tubes (without reducer piece). 

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2) making sure that, at each insertion, only the stick's screw is covered with the sample to take the appropriate amount of faecal sample (approx. 50mg) and add it to the collection tube. Any additional sample that exceeds the stick's screw could cause wrong results. For liquid samples, add approx. 125µL in the collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).



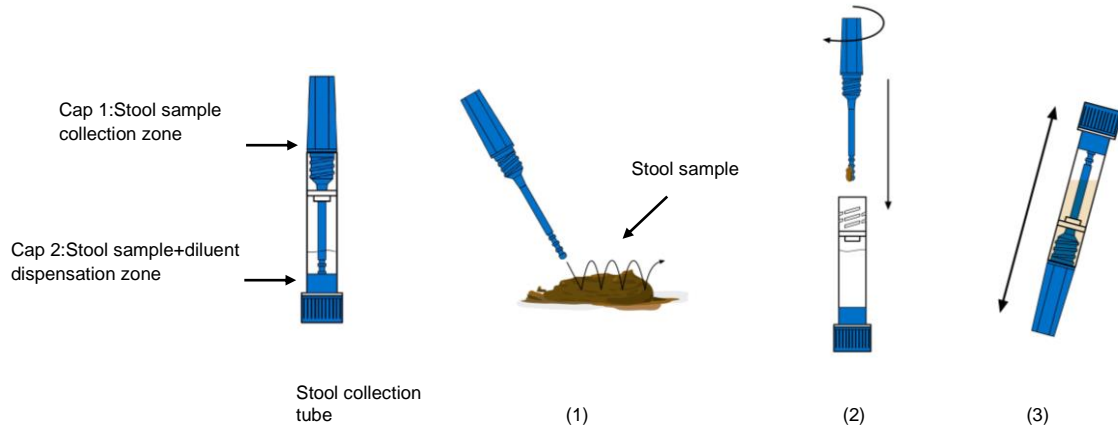
- b. “Transferrin” stool collection tube (with a reducer piece). 

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap 1 of the stool collection tube and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (1), making sure that, in each insertion, the stick's screw is covered with the sample to take the appropriate amount of stool. Then, introduce the sample in the stool collection tube (2). For liquid samples, add approx. 20µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample (2). Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3). The stool collection tube with dilute sample can be stored until 2 days at room temperature or until 5 days in the refrigerator (2-8°C) prior to testing.

CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
 Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

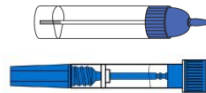


Precautions: Patients suffering from menstrual period, bleeding hemorrhoids, blood in urine or strain during bowel movement should not collect samples.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *H. pylori*+Transferrin combo card tests
- Instructions for use
- "*H. pylori*" stool collection tubes with diluent
- "Transferrin" stool collection tubes with diluent



MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

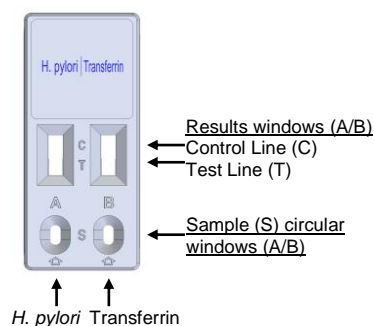
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay. Please take note that there are two procedures by using different stool collection tubes:

1. Proceed to shake each stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove the CerTest *H. pylori*+Transferrin combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the "*H. pylori*" stool collection tube, cut the end of the cap (4) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter A (5). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. Take the "Transferrin" stool collection tube, cut the end of the cap (6) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter B (7). Avoid adding solid particles with the liquid.
5. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

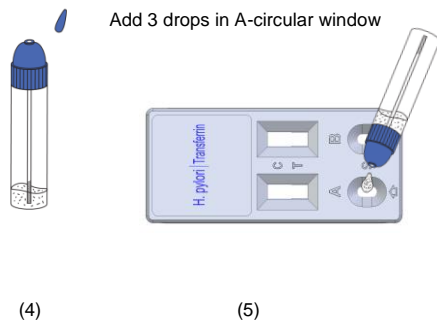
If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



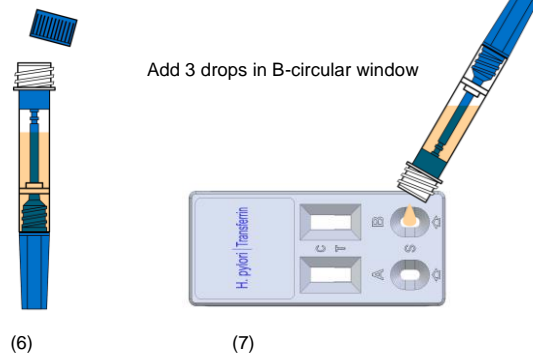
CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
 Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

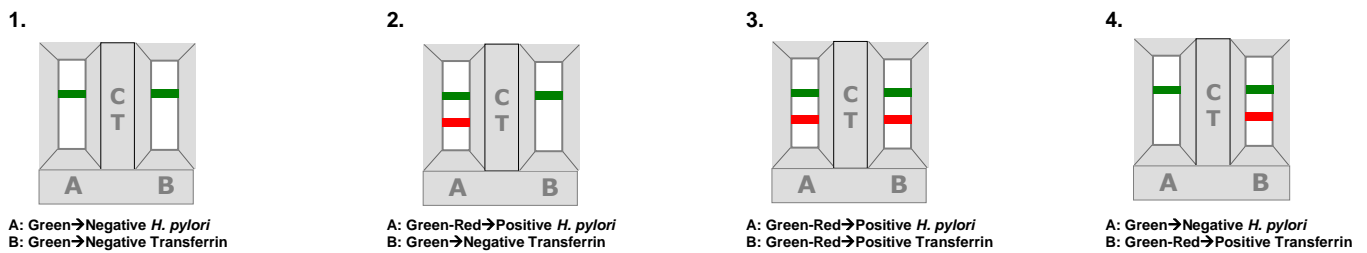
H. pylori Strip-A procedure



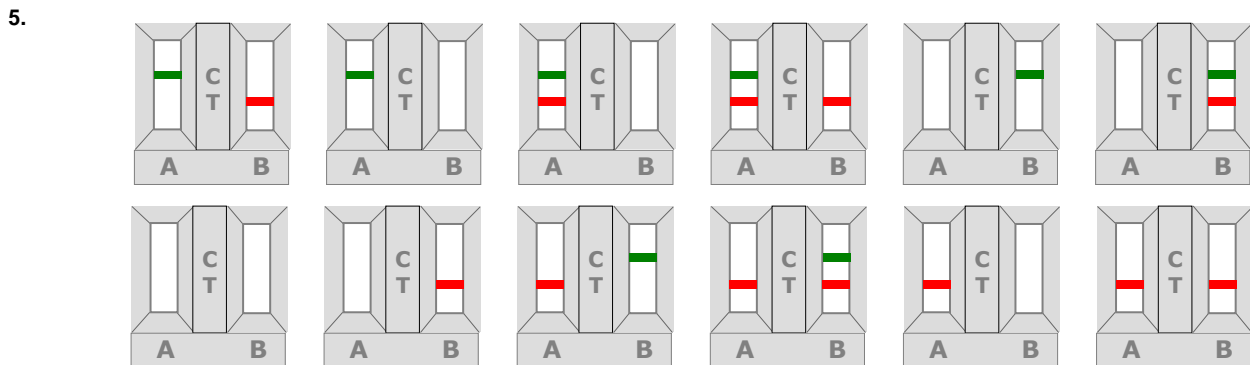
Transferrin Strip-B procedure



INTERPRETATION OF RESULTS (please refer to the illustration below)



INVALID RESULTS



	A (<i>H. pylori</i>)	B (Transferrin)	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	No infection caused by <i>H. pylori</i> and no gastrointestinal bleeding problem.
2.	+ GREEN-RED	- GREEN	Infection caused by <i>H. pylori</i> , without gastrointestinal bleeding.
3.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	Infection caused by <i>H. pylori</i> , with gastrointestinal bleeding, which might mean gastrointestinal diseases (stomach and duodenum) like gastritis, peptic ulcer disease and gastric carcinoma.
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	No infection caused by <i>H. pylori</i> but gastrointestinal bleeding problem.
5.	Any other result	Any other result	Invalid result either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persist, discontinue using the test kit and contact your local distributor.



CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of *H. pylori* and human transferrin present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high *H. pylori*/human transferrin concentration to faint when the *H. pylori*/human transferrin concentration is close to the detection limit and cut-off value of the test.
4. CerTest *H. pylori*+Transferrin should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
5. Positive results determine the presence of *H. pylori* and/or human transferrin in faecal samples; nevertheless, a positive result should be followed up with additional invasive techniques (endoscopy) to confirm the results. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations. Transferrin positive result can be also due to several causes besides colorectal bleeding, such as hemorrhoids, blood in urine or stomach irritations.
6. A negative result is not meaningful because of it is possible the *H. pylori* and/or human transferrin concentration in the stool sample is lower than the detection limit or cut-off value. If the symptoms or situation still persist, *H. pylori* determination should be carried out on a sample from an enrichment culture or other any technique. Transferrin negative results do not exclude bleeding, as some polyps and colorectal cancers may bleed intermittently or not during certain stages of the disease. Moreover, blood may not be uniformly distributed in stool samples.
7. Patients suffering from menstrual period, bleeding hemorrhoids, blood in urine or strain during bowel movement should not collect samples to detect transferrin (false positive result).
8. Mucous stool samples may cause non-specific reactions in the test- Every mucous stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.
9. Faecal samples whose antigen concentration is near to the cut-off value of the CerTest *H. pylori*+Transferrin test (only for Transferrin strip) could be lost if the sample has been diluted and preserved until 2 days at room temperature or until 5 days at 2-8°C until to be tested. For faecal samples near to the cut-off value is better to dilute the sample and make immediately the test.

EXPECTED VALUES

Studies have found that more than 90% of patients with duodenal ulcer and 80% of patients with gastric ulcer are infected with *Helicobacter pylori*. CerTest *H. pylori* has been compared with different methods: cultures, Urea Breath Test and Urease Test, demonstrating an overall accuracy of >92%.

Peptic ulcer is mostly the common cause of acute intestinal hemorrhage. *H. pylori* is a pathogenetic agent in chronic active gastritis and is strongly associated with ulcer disease.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

Detection limit range of CerTest *H. pylori*+Transferrin (*H. pylori* strip) is: 0.78ng/mL – 0.09ng/mL of *H. pylori* recombinant outer membrane protein.

Cut-off value of CerTest *H. pylori*+Transferrin (Transferrin strip) is 4ng/mL (0.4µg hTf/g of faeces) for human transferrin.

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest *H. pylori*+Transferrin, CerTest), and qPCR technique (VIASURE *Helicobacter pylori* Real Time Detection kit, CerTest) and another commercial ELISA test (Human Transferrin ELISA kit, ICL). The samples were taken from patients with the same as *Helicobacter pylori* infection symptoms arrived in Gastroenterology area in a Spanish hospital. The results were as follows:



CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

		qPCR test: Viasure <i>Helicobacter pylori</i> Real Time Detection kit		
		+	-	Total
IC test: <i>H. pylori</i> +Transferrin (<i>H. pylori</i>)	+	54	1	55
	-	1	60	61
	Total	55	61	116

CerTest <i>H. pylori</i> +Transferrin (<i>H. pylori</i>) vs Viasure <i>Helicobacter pylori</i> Real Time Detection Kit		
	Mean Value	95% CI (confidence interval)
Sensitivity	98.2%	90.3 – 100.0%
Specificity	98.4%	91.2 – 100.0%
PPV	98.2%	90.3 – 100.0%
NPV	98.4%	91.2 – 100.0%

Data for cut-off value 0.4 µg hTf/g

		ELISA test: Human Transferrin ELISA kit		
		+	-	Total
IC test: <i>H. pylori</i> +Transferrin (Transferrin)	+	38	3	41
	-	12	47	59
	Total	50	50	100

CerTest <i>H. pylori</i> +Transferrin (Strip B:Transferrin) vs Human Transferrin ELISA kit		
	Mean Value	95% CI (confidence interval)
Sensitivity	76.0%	61.8 – 100.0%
Specificity	94.0%	83.5 – 98.7%
PPV	92.7%	80.1 – 98.5%
NPV	79.7%	67.2 – 98.0%

Sensitivity for a cut-off value of 2 µg hTf/g: 81.1% (mean value), 64.8-92.0% (95% confidence interval)

Sensitivity for a cut-off value of 0.2 µg hTf/g: 96.3% (mean value), 81.0-99.9% (95% confidence interval)

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *H. pylori* and human transferrin using CerTest *H. pylori*+Transferrin.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *H. pylori*+Transferrin; no cross reactivity against other gastrointestinal pathogens, other organism, substances and/or faecal markers occasionally present in faeces:

For Strip A: ***H. pylori***

<i>Adenovirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Human transferrin</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Bovine haemoglobin</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Giardia</i>	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	<i>Pig haemoglobin</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A	<i>Human calprotectin</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	<i>Human haemoglobin</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Human lactoferrin</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9



CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

For Strip B: Transferrin

<i>Adenovirus</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Human lactoferrin</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Bovine haemoglobin</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Bovine transferrin</i>	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Pig haemoglobin</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	<i>Giardia</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	<i>Human calprotectin</i>	<i>Salmonella paratyphi</i> A	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Human haemoglobin</i>	<i>Salmonella typhi</i>	



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest *H. pylori*+Transferrin combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *H. pylori* y transferrina en muestras de heces.

CerTest *H. pylori*+Transferrin combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo, de alta sensibilidad y no invasivo para determinar la presencia de *H. pylori* que causa las úlceras gástricas y duodenales y la presencia de hemorragia gastrointestinal, y también sirve para determinar la erradicación de *H. pylori* tras el tratamiento de la infección.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria con forma espiral que se encuentra en la mucosa gástrica o adherida a la capa epitelial del estómago. Se estima que esta bacteria es la causante de más del 90% de las úlceras duodenales y por encima del 80% de los carcinomas gástricos. La importancia de la detección de *Helicobacter pylori* ha aumentado desde que se conoce la fuerte correlación que existe entre la presencia de la bacteria y la confirmación de enfermedades gastrointestinales (estómago y duodeno) tales como gastritis, úlcera péptica y carcinoma gástrico. Los pacientes que sufren de úlcera gastro-duodenal pueden desarrollar complicaciones como la hemorragia o perforación en la zona alta del aparato digestivo. Un diagnóstico preciso de erradicación de *H. pylori* reduce significativamente el riesgo de reactivación de la úlcera, y por lo tanto previene de que nuevos episodios de sangrado gastrointestinal superior se produzcan. Los métodos invasivos y no invasivos se utilizan para el diagnóstico de infección por *H. pylori* en pacientes con síntomas de enfermedad gastrointestinales.

La transferrina es un componente derivado de la sangre que puede llegar al tracto gastrointestinal y eliminarse mediante las heces, causado por algunas enfermedades gastrointestinales que llevan asociado una pérdida de sangre. La transferrina es estable en las heces y es un buen marcador para detectar pérdidas de sangre de origen gastrointestinal.

Este test inmunocromatográfico detecta *H. pylori* y transferrina humana en muestra de heces de forma simultánea, obteniendo así unos resultados más precisos en la infección con *H. pylori*.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *H. pylori*+Transferrin es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección de *H. pylori* y transferrina en muestras de heces.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *H. pylori* en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *H. pylori*) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a transferrina en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a transferrina) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es *H. pylori* positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*H. pylori*-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es transferrina positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-transferrina-microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-*H. pylori* presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-transferrina presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de *H. pylori* y transferrina o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y valor de cut-off y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-*H. pylori* y anti-transferrina presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en ambas tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo combo card test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *H. pylori*+Transferrin test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- La presencia de líneas amarillentas en la ventana de resultados (zona línea de control y zona línea de test), antes de utilizar el test, es completamente normal y no supone fallo de funcionalidad del test.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), durante 1-2 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

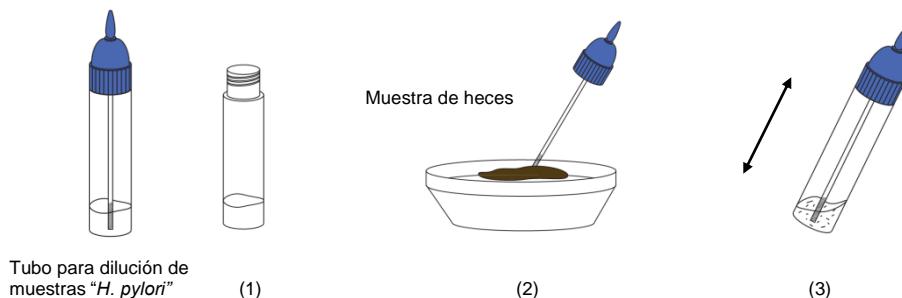
Por favor, observe que hay dos tubos de dilución de muestras diferentes.

a. Tubo para dilución de muestra "*H. pylori*" (Sin reductor).



Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución de muestra (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), asegurándose de que, en cada inserción, la hélice del palito se cubra con la muestra para tomar la cantidad adecuada de heces (aprox. 50mg) y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Si se añade cantidad de muestra adicional que sobrepase la hélice del palito se podrían originar resultados erróneos. Para muestras líquidas, añada aprox. 125µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



b. Tubo para dilución de muestra "Transferrin" (Con reductor).



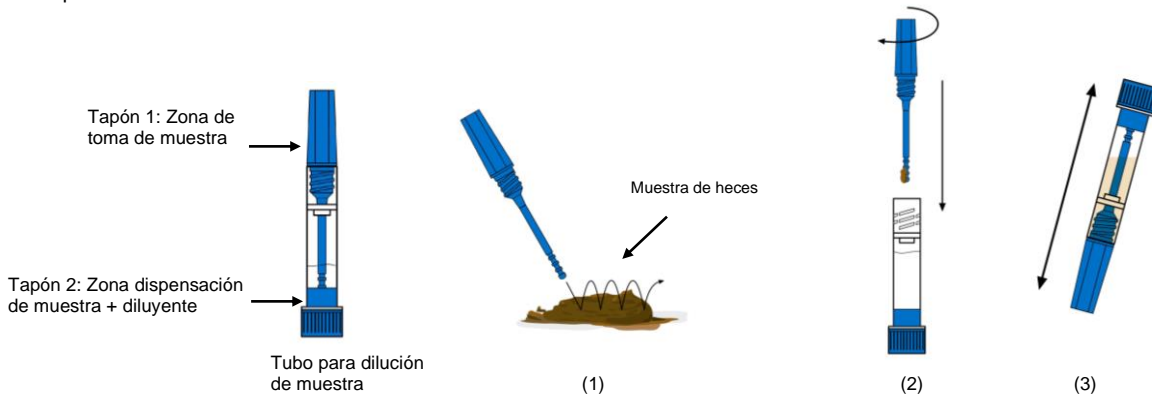
Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tapón 1 del tubo para dilución de muestra y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se debe introducir el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (1), asegurándose de que, en cada inserción, la hélice del palito se cubra con la muestra para tomar la cantidad adecuada de heces. A continuación, introducir la muestra en el tubo para dilución de muestra (2). Para muestras líquidas, añada aprox. 20µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.

CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

- Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente (2). Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3). El tubo que contiene la muestra diluida puede conservarse durante 2 días a temperatura ambiente o en frío (2-8°C) durante 5 días antes de realizar la prueba.

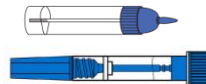


Precauciones: No se deben obtener muestras de pacientes si tienen su periodo menstrual, si presentan hemorroides sangrantes, sangre en orina o estreñimiento.

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *H. pylori*+Transferrin combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra "*H. pylori*" con diluyente
- Tubos para dilución de muestra "Transferrin" con diluyente



MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

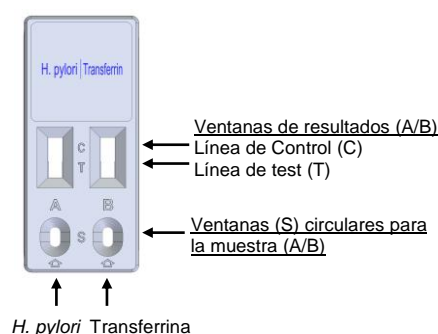
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

Previamente los tests, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

- Agitar los tubos para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
- Sacar el test CerTest *H. pylori*+Transferrin de su envase antes de utilizarlo.
- Tomar el tubo para dilución de muestra para "*H. pylori*", cortar la punta del tapón (4) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
- Tomar el tubo para dilución de muestra para "Transferrin", cortar la punta del tapón (6) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (7), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
- Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados

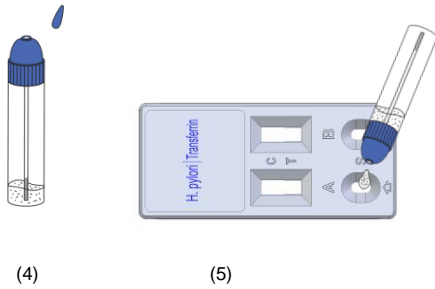


CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

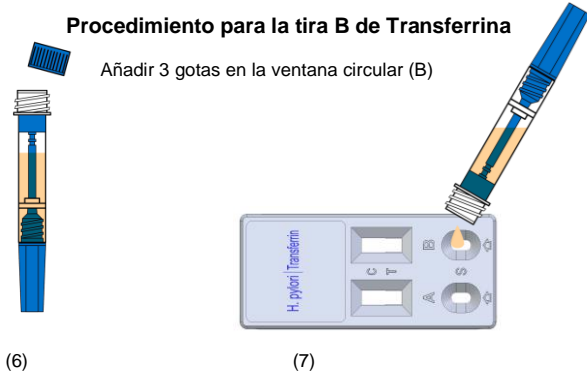
Procedimiento para la tira A de *H. pylori*

Añadir 3 gotas en la ventana circular (A)



Procedimiento para la tira B de Transferrina

Añadir 3 gotas en la ventana circular (B)



INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

- A: Verde→Negativo *H. pylori*
B: Verde→Negativo Transferrina
- A: Verde-Rojo→Positivo *H. pylori*
B: Verde→Negativo Transferrina
- A: Verde-Rojo→Positivo *H. pylori*
B: Verde-Rojo→Positivo Transferrina
- A: Verde→Negativo *H. pylori*
B: Verde-Rojo→Positivo Transferrina

RESULTADOS INVÁLIDOS

-

	A (<i>H. pylori</i>)	B (Transferrina)	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No hay infección causada por <i>H. pylori</i> , ni sangrado gastrointestinal.
2.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Infección causada por <i>H. pylori</i> sin hemorragia gastrointestinal.
3.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Infección causada por <i>H. pylori</i> con hemorragia gastrointestinal, lo que podría significar presencia de enfermedades gastrointestinales (estómago y duodeno) como gastritis, úlcera péptica y carcinoma gástrico.
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	No hay infección causada por <i>H. pylori</i> pero existe un problema de hemorragia gastrointestinal.
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido en A o en B: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en la línea de test (T) en la ventana de resultados variará dependiendo de la concentración de *H. pylori* y transferrina humana presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

1. Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
2. Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
3. La intensidad de la línea de test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de *H. pylori*/transferrina humana a débil cuando la concentración de *H. pylori*/transferrina humana está cerca del valor del límite de detección y cut-off del test.
4. CerTest *H. pylori*+Transferrin debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
5. Los resultados positivos determinan la presencia de *H. pylori* y/o transferrina humana en muestras de heces; sin embargo, un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas invasivas (endoscopia) para confirmar los resultados. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas. Un resultado positivo de transferrina puede ser debido a varias causas, como hemorroides, sangre en orina o irritaciones estomacales.
6. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente porque puede darse que la concentración de *H. pylori* o transferrina humana en la muestra de heces sea inferior al valor del límite de detección y cut-off del test. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de *H. pylori*, se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento u otras técnicas. Resultados negativos de transferrina no excluyen las hemorragias causadas por algunos pólipos ni el cáncer colorrectal, ya que pueden provocar hemorragias de forma intermitente o no provocarlas durante alguna fase de la enfermedad. Además, la sangre podría no haberse distribuido de manera uniforme en la muestra de heces.
7. No se deben obtener muestras de pacientes si tienen su periodo menstrual, si presentan hemorroides sangrantes, sangre en orina o estreñimiento.
8. Muestra de heces mucosas podrían provocar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra de heces mucosas cuyo resultado sea positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas para confirmar el resultado.
9. Muestras de heces cuya concentración de antígeno esté cerca del valor de cut-off de CerTest *H. pylori*+Transferrin (para tira: Transferrin) podrían llegar a perderse si la muestra ha sido diluida y conservada hasta 2 días a temperatura ambiente o hasta 5 días a 2-8°C antes de ser probada. Para las muestras de heces cercanas al valor de cut-off del test es mejor diluir la muestra y realizar el test inmediatamente.

VALORES ESPERADOS

Diversos estudios han encontrado que más del 90% de pacientes con úlceras duodenales y un 80% de pacientes con úlcera gástrica están infectados con *Helicobacter pylori*. CerTest *H. pylori* ha sido comparado con diferentes métodos: cultivos, Test del Aliento y Test de la Ureasa, mostrando una exactitud >92%.

La causa más común de hemorragia intestinal aguda son las úlceras pépticas. *H. pylori* es un agente patógeno en la gastritis crónica activa y está fuertemente relacionado con las úlceras.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica

Rango límite detección de CerTest *H. pylori*+Transferrin (tira *H. pylori*) es: 0.78ng/mL – 0.09ng/mL de proteína recombinante de membrana externa de *H. pylori*.

Valor de cut-off de CerTest *H. pylori*+Transferrin (tira Transferrin) es 4ng/mL (0.4µg hTf/g de heces) para transferrina humana.

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación comparando los resultados obtenidos con un test inmunocromatográfico (CerTest *H. pylori*+Transferrin, CerTest), y técnica qPCR (VIASURE *Helicobacter pylori* Real Time Detection Kit, CerTest) y otro test inmunocromatográfico comercializado (Human Hexagon, OBTI). Las muestras fueron tomadas de pacientes con síntomas de infección por *Helicobacter pylori* del área de gastroenterología de un hospital español. Los resultados se muestran a continuación:

		qPCR test: Viasure <i>Helicobacter pylori</i> Real Time Detection kit		
		+	-	Total
IC test: <i>H. pylori</i> +Transferrin (<i>H. pylori</i>)	+	54	1	55
	-	1	60	61
	Total	55	61	116

CerTest <i>H. pylori</i> +Transferrin (<i>H. pylori</i>) vs Viasure <i>Helicobacter pylori</i> Real Time Detection Kit		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	98.2%	90.3 – 100.0%
Especificidad	98.4%	91.2 – 100.0%
VPP	98.2%	90.3 - 100.0%
VPN	98.4%	91.2 –100.0%

		ELISA test: Human Transferrin ELISA kit		
		+	+	+
IC test: <i>H. pylori</i> +Transferrin (Transferrin)	+	38	38	38
	-	12	12	12
	Total	50	50	50

CerTest <i>H. pylori</i> +Transferrin (Strip B:Transferrin) vs Human Transferrin ELISA kit		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	76.0%	61.8 – 100.0%
Especificidad	94.0%	83.5 – 98.7%
VPP	92.7%	80.1 – 98.5%
VPN	79.7%	67.2 –98.0%

Sensibilidad para un valor de cut-off value de 2 µg hTf/g: 81.1% (valor medio); 64,8-92.0% (95% intervalo de confianza).

Especificidad para un valor de cut-off value de 0.2 µg hTf/g: 96.3% (valor medio); 81.0-99.9% (95% intervalo de confianza).

Los resultados mostraron que CerTest *H. pylori*+Transferrin presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. pylori* y transferrina humana.



CERTEST *H. pylori*+Transferrin

One Step test to detect *H. pylori* and human transferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de *H. pylori* y transferrina humana en formato cassette

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de CerTest *H. pylori*+Transferrin; no se detectó reacción cruzada con otros patógenos gastrointestinales, otros organismos, sustancias y/o marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces:

Para la tira A: *H. pylori*

<i>Adenovirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Calprotectina humana</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Giardia</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile antigen GDH</i>	<i>Hemoglobina bobina</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile Toxin A</i>	<i>Hemoglobina de cerdo</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Transferrina humana</i>
<i>Clostridium difficile Toxin B</i>	<i>Hemoglobina humana</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Lactoferrina humana</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9

Para la tira B: **Transferrin**

<i>Adenovirus</i>	<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Lactoferrina humana</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Calprotectina humana</i>	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Norovirus GII</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile antigen GDH</i>	<i>Giardia</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile Toxin A</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Transferrina bovina</i>
<i>Clostridium difficile Toxin B</i>	<i>Hemoglobina bovina</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Hemoglobina de cerdo</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Cryptosporidium</i>	<i>Hemoglobina humana</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. Bruce E. Dunn, Hartley Cohen & Martin J. Blaser. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. Rev. 10 (4), 720-741, Oct. (1997).
2. Martin J. Blaser. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. BMJ; 316: 1507-1510 (1998).
3. John L. Telford, Antonello Covacci, Rino Rappuoli & Paolo Ghiara. *Immunobiology of Helicobacter pylori* infections. Current Opinion in Immunology, 9; 498-503 (1997).
4. Virtanen et al., "Higher concentrations of serum transferrin receptor in children than in adults", Am. J. Clin. Nutr. 1999; 69: 256-60.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD <i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	Keep dry Almacenar en lugar seco	Use by Fecha de caducidad	Manufacturer Fabricante	LOT Batch code Número de lote
Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	Temperature limitation Limitación de temperatura	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL Sample diluent Diluyente de muestra	REF Catalogue number Número de referencia
Do not re-use No reutilizar	CE CE marking/ Marcado CE			



