



ENZYWELL

HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/Fabricado por:
DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX / INDICE / CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / INDICACIONES DE USO/ UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPIODEL MÉTODO / PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS /ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / PROCEDIMIENTO DEL TEST
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDADE DO ENSAIO
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS /ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRECISIÓN / PRECISÃO
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" GUIDE / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / REFERÊNCIAS



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG**

REF 91060

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E SEMIQUANTITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI HELICOBACTER PYLORI NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA H. PYLORI.

2. INTRODUZIONE

Nel 1983, Warren e Marshall identificarono, in pazienti affetti da gastrite, un nuovo patogeno batterico gram-negativo denominato Helicobacter pylori. In seguito sono stati eseguiti diversi studi allo scopo di chiarire il rapporto fra l'infezione batterica e patologie gastriche croniche. E' stato dimostrato che il patogeno è associato all'ulcera peptica, alla gastrite cronica di tipo B, e alla duodenite. E' stato dimostrato che, in pazienti affetti da gastrite, l'eliminazione del batterio portava alla guarigione della lesione anatomica.

Le procedure diagnostiche dirette alla rivelazione dell'organismo prevedono normalmente delle tecniche invasive (gastroscopiche) per il prelievo di un campione biotico.

Si osserva tuttavia nel paziente infetto, una risposta immune specifica. Il test sierologico rappresenta quindi un valido metodo alternativo rispetto alla tecnica invasiva biotica. I livelli delle IgG aumentano durante il corso dell'infezione e si mantengono costanti nel tempo a meno che l'infezione non venga eradicata. L'efficacia della terapia antimicrobica può quindi essere monitorata attraverso le modificazioni nei livelli degli anticorpi specifici.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

L'antigene viene legato alla fase solida. Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene.

Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

La densità del colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame. Quando la reazione enzimatica è interrotta per aggiunta di una soluzione di acido solforico la colorazione gialla che ne deriva può essere facilmente letta in un lettore per micropiastre ELISA.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

- **Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 pozzetti sensibilizzati con Helicobacter pylori.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (P, seguita dal numero di lotto) che serve per l'identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CAL CALIBRATORI 5 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito a concentrazione nota di anticorpi anti-Helicobacter pylori in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%. Liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

I 5 calibratori hanno i seguenti titoli espressi in Unità Arbitrarie/ml:

Cal 1 5 UA/ml (Calibratore Negativo),

Cal 2 (Cut-off Pediatrico) 10 UA/ml

Cal 3 (Cut-off Adulti) 15 UA/ml

Cal 4 50 UA/ml

Cal 5 100 UA/ml

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane coniugati con perossidasi, in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capaci di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	6 settimane 2/8°C busta di polietilene
CALIBRATORI	6 settimane 2/8°C
CONIUGATO	6 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C; 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO**

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato contiene fenolo
 - c) Il substrato è acido
 - d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si seccino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a

2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.

- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente. Lasciare un pozzetto libero per il bianco (si userà solo per il substrato).

Distribuire 100 µL dei calibratori NON DILUITI nei pozzetti previsti, possibilmente in duplicato, e 100 µL di campione diluito nei rimanenti pozzetti.

Coprire i pozzetti con la pellicola protettiva ed incubare per 45 min. a 37°C. Lavare 4 volte lasciando la soluzione di lavaggio (300 µL) nei pozzetti per 30 secondi per ogni ciclo. Aggiungere 100 µL del coniugato in ciascun pozzetto ed incubare di nuovo per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Lavare di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi distribuire il Substrato (100 µL/pozzetto). Dopo 15 min. a temperatura ambiente bloccare la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Leggere le densità ottiche (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

9. Schema del saggio

STEP 1	Pipettare 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti della micropiastra <input type="checkbox"/>
	incubare 45 min. a 37°C <input type="checkbox"/>
	lavare 4 volte (300 µL) <input type="checkbox"/>
STEP 2	Pipettare 100 µL di coniugato per pozzetto <input type="checkbox"/>
	incubare 45 min. a 37°C <input type="checkbox"/>
	lavare 4 volte (300 µL) <input type="checkbox"/>
STEP 3	Pipettare 100 µL di Substrato per pozzetto <input type="checkbox"/>
	incubare 15 min. a t.a. <input type="checkbox"/>
STEP 4	aggiungere 100 µL di Soluzione Bloccante <input type="checkbox"/>
	leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 0.150) a tutte le altre letture. La O.D. del Calibratore 3 deve essere ≥ 0.2 di O.D. Il Calibratore 5 deve avere una O.D. pari almeno a 1.5 volte il Calibratore 3.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

Il Cut-off dei sieri di adulti corrisponde al Calibrator 3.

Il Cut-off dei sieri pediatrici corrisponde al Calibrator 2.

Calcolare il rapporto fra il valore medio delle O.D. del campione in esame e quello del Cut-Off (INDEX). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ del Cut-Off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

Risultati semiquantitativi

Riportare in grafico le D.O. dei calibratori, sottratte dalla D.O. del bianco, in funzione del titolo di ciascun calibratore. Ottenere il titolo corrispondente del campione in esame per interpolazione.

NOTA: Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.

Se la D.O. di un campione o calibratore è superiore a 2,0, leggere a 405 nm e moltiplicare il valore per 3.

Il grado di immunità può essere interpretato come segue:

IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-H. pylori nel campione è > 10 UA/mL (per pazienti pediatrici)
> 15 UA/ml (per pazienti adulti)

NON IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-H. pylori è < 5 UA/mL.

DUBBIO: quando il valore è compreso fra i due valori. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta precoce dell'infezione potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

Sieri fortemente lipemici, emolizzati od inattivati col calore possono dare luogo a risultati falsi e non dovrebbero essere quindi utilizzati.

Come per tutti i tests sierologici, il risultato deve essere comunque valutato insieme ad altri dati clinici e diagnostici.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

La specificità analitica del kit Enzywell H. Pylori IgG è stata valutata con un test di inibizione. Ai campioni di siero di pazienti sono stati aggiunti *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni* e *E. coli*. Non si sono osservate differenze tra i campioni di riferimento e gli stessi contenenti gli antigeni di cui sopra. Pertanto si conclude che il test in oggetto è specifico per gli anticorpi IgG anti-*Helicobacter pylori*.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 199 campioni, 58 dei quali prelevati nel Reparto di Gastroenterologia; 138 sieri risultavano positivi. I campioni sono stati analizzati anche con il Western Blot, considerato il metodo di riferimento.

Risultati

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	132	6
	-	1	60

Il kit *Helicobacter pylori* presentava 6 falsi negativi ed 1 falso positivo.

La sensibilità e la specificità sono risultate del 99,2% e del 90,9% rispettivamente.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

Cut Off n=16	Batch. N. 78	Batch. N. 79	Batch. N. 80
O.D.	0.419	0.608	0.6
CV%	12	15	10

Precisione tra sedute

Campione	AU/ml				
	I run	II run	III run	Media	CV%
PYG1	6.2	7	6.1	6.4	8
PYG2	24.8	26.1	23.9	24.9	4
PYG3	81.3	88.4	84.8	84.8	4

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi informazioni tecniche per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

RIEDEL
PHARMACEUTICALS
INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE AND SEMIQUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO HELICOBACTER PYLORI IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF H. PYLORI INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

In 1983, Warren and Marshall identified *Helicobacter pylori*, a new gram-negative bacterial pathogen, in patients suffering from gastritis, and this finding led to studies on the relationship between bacterial infection and chronic gastric disease. The pathogen has been shown to be associated with peptic ulcer, chronic gastritis type B and duodenitis. It has been demonstrated that in patients with gastritis, eradication of the bacteria led to healing of the anatomical lesion.

Diagnostic procedures for the detection of the organism generally involve invasive (gastroscopic) techniques for sample collection.

However, a specific immune response is seen in infected patients. The serological test thus represents a useful alternative to the invasive bioptic technique. IgG levels rise with infection and remain constantly high until the infection is eliminated. The efficacy of antimicrobial therapy can therefore be monitored via changes in specific IgG antibody.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase.

The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added.

The density of the colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. When the enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulfuric acid solution, the resulting yellow colour can be easily read on an ELISA microplate reader.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

- **Bring reagents to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells coated with *Helicobacter pylori* antigens.

Use: open the package at the opposite end from the code (P, followed by the lot number) which serves for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CAL CALIBRATORS 5 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum at known concentrations of antibodies to *Helicobacter pylori*, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use without further dilution.

The 5 calibrators have the following titers expressed in Arbitrary Units/ml:

Cal 1	5 AU/ml (Negative Calibrator)
Cal 2 (Pediatric Cut-off)	10 AU/ml
Cal 3 (Adult Cut-off)	15 AU/ml
Cal 4	50 AU/ml
Cal 5	100 AU/ml

Colour: the colour of the calibrators is proportional to the relative antibody titer.

CONJ CONJUGATE 1x16 mL

Contents: monoclonal antibodies anti-human IgG labelled with Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

WASH BUF WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to dilute samples.

Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 225-375 µl
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
Microplate	6 weeks at 2/8°C, polythene bag
Calibrators	6 weeks at 2/8°C
Conjugate	6 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
- servicing and maintenance

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully mixed before performing the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

The test is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Dilute the samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Leave one well empty for the blank (only the substrate will be used). Pipet 100 µL of UNDILUTED calibrators in the wells of a strip, preferably in duplicate, and 100 µL of diluted sample in the remaining wells.

Cover the wells with protective film and incubate for 45 minutes at 37°C. After washing four times (300 µL), soaking the wells in the washing solution for 30 seconds for each cycle, add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. Wash the plate again 4 times, as described above. Finally, add the Substrate (100 µL/well).

After 15 minutes at room temperature, stop the enzymatic reaction with 100 µL of Stop Solution.

Read the optical densities (O.D.) at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min. Take a new reading at 405 nm if the O.D. are higher than 2000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1	Place 100 µL of diluted sample//controls in the wells of the microplate. <input type="checkbox"/>
	Incubate for 45 min. at 37°C <input type="checkbox"/>
	Wash 4 times (300 µL) <input type="checkbox"/>
STEP 2	Add 100 µL of conjugate to each well <input type="checkbox"/>
	Incubate for 45 min. at 37°C <input type="checkbox"/>
	Wash 4 times (300 µL) <input type="checkbox"/>
STEP 3	Add 100 µL of Substrate to each well <input type="checkbox"/>
	Incubate for 15 min. at R.T. <input type="checkbox"/>
STEP 4	Add 100 µL of Stop Solution <input type="checkbox"/>
	Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the optical density (O.D.) of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. The O.D. of Calibrator 3 must be ≥ 0.2 . Calibrator 5 must have an optical density (O.D.) at least 1.5 times that of Calibrator 3.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTSQualitative results

The Cut-off for adult sera corresponds to Calibrator 3. The Cut-off for pediatric sera corresponds to Calibrator 2.

Calculate the ratio between the average O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX). The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2 .

Doubtful: $\pm 20\%$ of the Cut-Off.

Negative: if the ratio is < 0.8 .

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

Semiquantitative results

Report the OD of the calibrators on a graph after subtracting the OD of the blank. The corresponding titer of the test sample can be obtained by interpolation.

NOTE: A standard curve must be performed for each run.

If the O.D. of any sample or calibrator is over 2.0, take the reading at 405 nm and multiply the value by 3.

The degree of immunity can be interpreted as follows:

IMMUNE: when the anti-H. Pylori IgG concentration in the sample is > 10 AU/ml (for pediatric patients)
>15 AU/ml (for adult patients)

NON IMMUNE: when the anti-H. pylori IgG concentration is < 5 AU/mL

DOUBTFUL : if the result is between the two values. In this case it is advisable to repeat the test in duplicate.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the early acute phase of infection may be negative by this procedure.

Highly lipemic, icteric, hemolysed or heat-inactivated sera may cause false results and should not be used.

As with all serological tests, the results should be interpreted in conjunction with other clinical and diagnostic data.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

The analytical specificity of the Enzywell H. Pylori IgG kit was evaluated in an inhibition test. Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni and E. coli were added to patients' serum samples. No differences were observed between the reference samples and those containing the antigens reported above. It can therefore be concluded that the test is specific for anti-Helicobacter pylori IgG.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial carried out in a hospital laboratory, 199 human sera were analyzed, 58 of which came from the Gastroenterology Department. Out of the total, 138 gave a positive result.

The samples were analyzed in Western blot, considered the reference method.

Results

		REFERENCE	
		+	-
DIESE	+	132	6
	-	1	60

The Helicobacter pylori kit result 6 false negative and 1 false positive.

The sensitivity and specificity were respectively 99.2% and 90.9%.

15. PRECISION**Within run Precision on three different lots**

Cut Off n=16	Batch. N. 78	Batch. N. 79	Batch. N. 80
O.D.	0.419	0.608	0.6
CV%	12	15	10

Between run Precision

Sample	AU/ml				CV%
	I run	II run	III run	Average	
PYG1	6.2	7	6.1	6.4	8
PYG2	24.8	26.1	23.9	24.9	4
PYG3	81.3	88.4	84.8	84.8	4

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see instructions for use point 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. Marshall B.J. and Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* i, 1311 (1984).
2. Jones D.M., Lessels A.M., Eldridge J.: Campylobacter-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. *J. Clin. Pathol.* 37: 1002 (1984).
3. Blaser M.J.: H. pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Inf. Dis.* 161: 626 (1990).
4. Valle J., Seppä, J., K., Sipponen P., Kasunen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of H. pylori: a morphometric study. *Scand. J. Gastroenterology* 26: 1057 (1991).
5. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem.* 22: 1243 (1976).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y SEMICUANTITATIVA DE LOS ANTICUERPOS IgG ANTI HELICOBACTER PYLORI EN SUERO HUMANO, COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL H. PYLORI.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

In 1983, Warren y Marshall identificaron, en pacientes afectados por gastritis, un nuevo patógeno bacterial gram-negativo llamado Helicobacter pylori. Luego se hicieron varios estudios para aclarar la relación entre la infección bacterial y patologías gástricas crónicas. Se demostró que el patógeno se asocia a la úlcera péptica, a la gastritis crónica de tipo B, y a la duodenitis. Se demostró que, en pacientes afectados por gastritis, la eliminación de la bacteria conducía a la curación de la lesión anatómica.

Los procedimientos de diagnóstico dirigidos a la revelación del organismo previenen normalmente métodos invasivos (gastroscópicos) para la recolección de una muestra bióptica.

Se observa de todas formas en el paciente infectado, una respuesta inmune específica. El test serológico representa por eso un válido método alternativo con respecto a la técnica invasiva bióptica. Los niveles de las IgG aumentan durante el curso de la infección y se mantienen constantes en el tiempo hasta que la infección no sea eliminada. La eficacia de la terapia anti-microbiana puede por eso ser monitorizada a través de las modificaciones en los niveles de los anticuerpos específicos. La determinación de las IgA es complementaria a la de las IgG. Ya que en algunos casos la concentración de las IgA en los pacientes tratados disminuye más rápidamente con respecto a las IgG, puede ayudar en el follow-up de los pacientes. Por motivos desconocidos, alrededor del 2% de sueros son positivos sólo en el nivel de las IgA.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). El antígeno está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgG marcados con peroxidasa.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el substrato para la peroxidasa. La densidad del color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero. Cuando la reacción enzimática está interrumpida por adición de una solución de ácido sulfúrico la coloración amarilla que se desarrolla se puede fácilmente leer en un lector para microplacas ELISA.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de virus de Helicobacter pylori

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (P, seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL

Contenido: Suero humano a concentración conocida de anticuerpos anti- Helicobacter pylori, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional

Los 5 calibradores tienen las siguientes titulaciones expresadas en Unidades Arbitrarias/ml:

- Cal 1 5 UA/ml (Calibratore Negativo),
- Cal 2 (Cut-off Pediátrico) 10 UA/ml
- Cal 3 (Cut-off Adultos) 15 UA/ml

Cal 4 50 UA/ml
 Cal 5 100 UA/ml

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales humanos anti IgG conjugados marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución salina tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Para la dilución de las muestras de suero.

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS..

- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volúmenes entre 225-375 µl
- Agua Destilada o desionizada
- Guantes de un solo uso
- Contador de tiempo
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas para recoger precisamente 10, 100, 1000 µl de solución

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	CONDICIONES
MICROPLACA	6 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CALIBRADORES	6 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	6 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso, 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C,

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

Cuidado:

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos ,

cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, según disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El tampón de lavado contiene detergentes
 - b) El conjugado contiene fenol
 - c) El sustrato es ácido
 - d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroc্লórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
 - instalación y requisitos específicos
 - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
 - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo

- mantenimiento y servicio técnico

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Agitar las muestras descongeladas con cuidado antes de la titulación. La inactivación al calor puede provocar resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictericas, hemolizadas o contaminadas.

No aplicar el test a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, (se utilizará sólo para el sustrato).

Dispensar 100 µL de calibradores SIN DILUIR en los pocillos libres, posiblemente en duplicado, y 100 µL de muestra diluida en los pocillos restantes.

Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Sustrato, 100 µL/pozo.

Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.

Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min. Leer otra vez a 405 nm si se encuentran D.O. de valor superior a 2.000.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/ controles en los pocillos de la microplaca.

□

Incubar 45 min. a 37°C

□

Lavar 4 veces (300 µL)

□

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

□

Incubar 45 min. a 37°C

□

Lavar 4 veces (300 µL)

□

STEP 3 Añadir 100 µL de Sustrato a cada pocillo

□

Incubar 15 min. a T.A.

□

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-

Leer la absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

La D.O. del Calibrador 3 debe ser ≥ 0.2 de D.O. El Calibrador 5 debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Calibrador 3.

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en O.D. del Calibrador 3 debe ser ≥ 0.2 de D.O. El Calibrador 5 debe tener una D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Calibrador 3.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

1. Resultados cualitativos

El Cut-off de los sueros de adultos corresponde al Calibrador 3.

El Cut-off de los sueros pediátricos corresponde al Calibrador 2.

Calcular la relación entre el valor medio de O.D. de la muestra examinada y lo del Cut-off (INDEX).
La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2 .

Dudoso: $\pm 20\%$ del cut-off.

No-inmune: si la concentración es < 0.8 .

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado sigue siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

2. Resultados semicuantitativos

Reportar en gráfico las D.O. de los calibradores, subtraídas desde la D.O. del blanco, en función del título de cada calibrador.

Obtener el título correspondiente de la muestra examinada por interpolación.

NOTA: Ejecutar una curva estándar para cada serie.

Si la D.O. de una muestra o calibrador es más de 2,0, leer a 405 nm y mutiplicar el valor por 3.

La inmunidad se puede interpretar como sigue:

INMUNE: cuando la concentración de IgG anti-H. pylori en la muestra es > 10 UA/mL (para pacientes pediátricos)
 > 15 UA/ml (para pacientes adultos)

NO INMUNE: cuando la concentración de IgG anti-H. pylori es < 5 UA/mL.

DUDOSO: cuando el valor está entre los dos valores. En este caso se aconseja repetir la determinación en doble prueba.

12. LIMITACIONES

Sueros recolectados durante la fase aguda precoz de la infección podrían resultar negativos con esta técnica.

Sueros fuertemente lipémicos, hemolizados o inactivados con calor, pueden dar lugar a resultados falsos y no deberían ser utilizados.

Como para todos los tests serológicos, el resultado debe ser de todas formas evaluado junto con otros datos clínicos y de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica del kit Enzywell H. Pylori IgG ha sido evaluada con un test de inhibición. A las muestras de suero se añadieron *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni* e *E. coli*. No se observaron diferencias entre las muestras de referencia y aquellas que contenían los antígenos descritos anteriormente. Por lo tanto se concluye que el test examinado es específico para los anticuerpos IgG anti-*Helicobacter pylori*.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 199 muestras de suero, 58 de las cuales recogidas en el Departamento de Gastroenterología; 138 sueros resultaban positivos. Las muestras se analizaron también con el Western Blot, considerado el método de referencia.

Resultados

		REFERENCIA	
		+	-
DIESE	+	132	6
	-	1	60

El kit *Helicobacter pylori* dio 6 falsos negativos y 1 falso positivo.

La sensibilidad y la especificidad resultaron respectivamente 99.2% y 90.9%.

15. PRECISIÓN

Precisión intra - ensayo serie ejecutada sobre 3 lotes diferentes

Cut Off n=16	Batch. N. 78	Batch. N. 79	Batch. N. 80
O.D.	0.419	0.608	0.6
CV%	12	15	10

Precisión en series diferentes

Muestra	AU/ml				
	I run	II run	III run	Media	CV%
PYG1	6.2	7	6.1	6.4	8
PYG2	24.8	26.1	23.9	24.9	4
PYG3	81.3	88.4	84.8	84.8	4

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall B.J. and Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* i, 1311 (1984).
2. Jones D.M., Lessels A.M., Eldridge J.: *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. *J. Clin. Pathol.* 37: 1002 (1984).
3. Blaser M.J.: *H. pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Inf. Dis.* 161: 626 (1990).
4. Valle J., Sepp, I., K., Sipponen P., Kasunen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of *H. pylori*: a morphometric study. *Scand. J. Gastroenterology* 26: 1057 (1991).
5. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem.* 22: 1243 (1976).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060

(Português)

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Enzywell H.Pylori IgG é um método de ensaio de imuno-absorção enzimática indicado para a determinação qualitativa e semiquantitativa de anticorpos da classe IgG para Helicobacter Pylori no soro humano, como uma ajuda no diagnóstico de H. Pylori.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Em 1983, Warren e Marshall identificaram o Helicobacter pylori, um novo patógeno bacteriano gram-negativo, em pacientes com gastrite e esta descoberta conduziu a estudos sobre a relação entre infecção bacteriana e doença gástrica crónica. Concluiu-se que o patógeno está associado a úlcera péptica, gastrite crónica de tipo B e duodenite. Demonstrou-se que, em pacientes com gastrite, a erradicação da bactéria conduziu à cura da lesão anatómica. Os procedimentos de diagnóstico para a detecção do organismo geralmente envolvem técnicas invasivas (gastroscópicas) para recolha de amostras.

No entanto, verifica-se uma resposta imune específica nos pacientes infectados. O teste serológico representa, assim uma alternativa útil à técnica bióptica invasiva. Os níveis de IgG sobem com a infecção e permanecem constantemente elevados até que a infecção seja eliminada. A eficácia da terapia antimicrobiana pode, por isso, ser monitorizada através de alterações no anticorpo IgG específico.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática).

O antigénio liga-se à fase sólida. As imunoglobulinas são ligadas ao antigénio por incubação com soro humano diluído. Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto por anticorpos IgG humanos monoclonais marcados com peroxidase.

O conjugado desligado é eliminado e o substrato de peroxidase é adicionado.

A densidade da cor que se desenvolve é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes na amostra de soro. Quando a reacção enzimática é interrompida pela adição de uma solução de ácido sulfúrico, a cor amarela que se desenvolve pode ser facilmente lida usando um leitor de microplacas ELISA.

4. COMPONENTES DO KIT

Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 poços cobertos de antigénios de Helicobacter pylori.

Utilização: abra a embalagem no lado oposto ao código (P, seguido do número do lote), que é útil para fins de identificação, retire o suporte e as tiras da embalagem folheada para serem usadas e coloque as tiras não usadas no saco de polietileno com sílica gel, retire o ar e vede premindo o fecho.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-humanos IgG marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol a 0,05% e Bronidox a 0,02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, em concentrações conhecidas de anticorpos para Helicobacter pylori, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com a BSA 1% e azida de sódio a 0,09%. Líquido, pronto a ser usado sem mais diluição.

Os 5 calibradores têm os seguintes títulos expressos em Unidades Arbitrárias/ml:

Calibrador	Concentração
Cal 1 (Controlo Negativo)	5 AU/ml
Cal 2 (Directo Pediátrico)	10 AU/ml

Cal 3 (Directo Adulto)	15 AU/ml
Cal 4	50 AU/ml
Cal 5	100 AU/ml

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto a usar **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Um frasco contendo 12ml de tetrametilbenzidina a 0,26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0,01% estabilizado num tampão de citrato a 0,05 mol/L (pH 3,8).

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1x100 mL Para diluição de amostras de soro **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0,09% adicionado de metil-orange como corante.

WASH BUF 10X TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij a 0,5% .

Preparação: dilua o volume necessário na proporção de 1:10 com água destilada para obter o tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, estes devem ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602). 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ 0,3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas, comprimento de onda 450 ou 450/620 nm e 402 nm, com uma linearidade da DO até 2000 (no mínimo).
- Sistema de lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µL
- Água destilada ou desionizada.
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, tubos de teste, etc.
- Micropipetas e pontas (10, 100, 1000 µL) com precisão de ± 2%
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Recipientes para colheita de materiais potencialmente infecciosos
- Lenço absorvente.

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.

O prazo de validade está impresso em cada componente e no rótulo da embalagem

Os reagentes têm uma estabilidade limitada após a abertura e/ou preparação

REAGENTE	CONDIÇÕES
Microplaca	6 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Calibradores	6 semanas a 2/8°C
Conjugado	6 semanas a 2/8°C
Substrato	até ao prazo de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz
Diluyente de amostras	até ao prazo de validade a 2/8°C
Tampão de lavagem	2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C
Solução de paragem	até ao prazo de validade a 2/8°C

6. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

Para uso diagnóstico in vitro.

Este kit contém materiais de origem humana que foram testados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum

teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizadas devem ser tratados como resíduos infecciosos e portanto, eliminados em conformidade com as disposições legais aplicáveis.

- Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave bem as mãos quando tiver terminado.
 - Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
 - e) O tampão de lavagem contém detergentes
 - f) O conjugado e os controlos contêm fenol
 - g) O substrato é ácido
 - h) Os controlos contêm azida de sódio a 0,09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.
- Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.
- Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
 - O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e o ácido hidrolórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.
 - Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1,0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
 - Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com um lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1,0%, por exemplo, antes do trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

PRECAUÇÕES TÉCNICAS

- **Conserve a 2-8°C**
- Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após a utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Certifique-se de que o termóstato não desce abaixo de 35°C nem sobe acima de 39°C.**
- Abra o saco contendo as tiras pelo menos após 30 minutos à temperatura ambiente.
- Não utilize reagentes além do prazo de validade indicado. Deve evitar-se a contaminação microbiológica de reagentes, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
- Não modifique o procedimento de teste nem substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente, a menos que estejam indicados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
- Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
- Evite a utilização de congeladores auto-descongeláveis para armazenamento de amostras.
- Não exponha os reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
- Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
- Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
- Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não "sobre" as microplacas.
- Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C num banho de água com um rack ou uma bóia para suportar as placas, se necessário, ou num incubador. Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações, consulte o manual de instruções apropriado. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.

- Certifique-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa.
- A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.
- O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
- Para cada instrumento utilizado, leia atentamente o manual de instruções do fabricante para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
 - instalação e requisitos particulares
 - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
 - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
 - manutenção e reparação

7. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta por soro recolhido de forma normal numa veia e manuseado com todas as precauções ditadas pelas boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a -20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente misturadas antes de efectuar o teste. A inactivação de calor pode levar a resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana, o que leva a resultados erróneos.

Devem evitar-se amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictericas.

O teste não é aplicável ao plasma humano.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Dilua as amostras na proporção de 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço vazio para o branco que será realizado nos passos adequados distribuindo 100 µL de substrato e apenas 100 µL de solução de paragem. Distribua 100 µL de calibradores NÃO DILUÍDOS nos poços de uma tira, de preferência em duplicado e 100 µL da amostras diluída nos restantes poços.

Cubra os poços com filme protector e incube durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes (300 µl) com tempo de enxaguamento na solução de lavagem de 30 segundos para cada ciclo, junte 100 µL de conjugado e incube mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. Lave novamente a placa 4 vezes, como descrito acima. Por fim, adicione o Substrato (100 µL/poço) em cada poço.

Após 15 minutos à temperatura ambiente, pare a reacção enzimática com 100 µL de solução de paragem.

Leia as densidades ópticas (D.O.) a 450 nm ou a 450/620 nm dentro de 30 min. Faça uma nova leitura a 405 nm se a D.O. for superior a 2000.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
--

Deixe um poço vazio para o branco (A1)

- Coloque 100 µL de calibradores (não diluídos) e amostras diluídas (1:101) nos poços da microplaca.
- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave quatro vezes (300 µL).
- Adicione 100 µL de conjugado (à excepção do poço A1)
- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave quatro vezes (300 µL)
- Adicione 100 µL de substrato a cada poço (incluindo o poço A1)
- Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente
- Adicione 100 µl de solução de paragem em cada poço (incluindo o poço A1)
- Leia a absorvência a 450 nm dentro de 30 min.

10. VALIDADE DO ENSAIO

Subtraia o valor da densidade óptica do branco de todas as outras leituras. A D.O. do Calibrador 3 deve ser $\geq 0,2$. O Calibrador 5 deve ter uma D.O. a pelo menos 1,5 vezes a do Calibrador 3. A DO do branco deve ser $\leq 0,150$.

11. RESULTADOS

RESULTADOS SEMIQUANTITATIVOS

- Subtraia a D.O. do branco de todas as leituras para obter os valores de DO líquidos.
- Construa a curva de calibragem desenhando num papel milimétrico a DO líquida de cada calibrador contra a sua concentração AU/ml correspondente.

c. Faça a interpolação da DO da amostra líquida na curva de calibragem desenhada para obter a concentração da amostra correspondente.

NOTA: É necessário executar uma curva standard para cada ensaio.

Se a D.O. de cada amostra ou calibrador estiver acima de 2,0, faça a leitura a 405 nm e multiplique o valor por 3.

O grau de imunidade pode ser interpretado do seguinte modo:

IMUNE: Quando a concentração anti-H. Pylori IgG na amostra for
> 10 AU/ml (para pacientes pediátricos)
>15 AU/ml (para pacientes adultos)

NÃO IMUNE: quando a concentração anti-H. pylori IgG for < 5 AU/mL

DUVIDOSO: se o resultado estiver entre os dois valores. Neste caso, é aconselhável repetir o teste em duplicado.

RESULTADOS QUALITATIVOS

Subtraia a D.O. do branco de todas as leituras para obter os valores de DO líquidos.

O valor directo para os soros de adultos corresponde ao Calibrador 3. O valor directo para soros pediátricos corresponde ao Calibrador 2.

Calcule a relação entre o valor DO líquido médio da amostra e o do directo (cut-off). Esta relação é o Índice Directo (COI). A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1,2.

Duvidosa: Se a relação estiver entre 0,8-1,2 ($\pm 20\%$ do valor directo)

Negativa: se a relação for < 0,8.

se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda precoce de infecção pode revelar-se negativa por este procedimento. Soros altamente lipémicos, ictéricos, hemolizados ou inactivados por calor podem provocar resultados e não devem ser usados.

Como acontece com todos os testes serológicos, os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos e de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

A especificidade analítica do kit Enzywell H. Pylori IgG foi avaliada num teste de inibição. Adicionou-se *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni* e *E. coli* às amostras de soro dos pacientes. Não se verificaram diferenças entre as amostras de referência e as amostras contendo os antigénios acima indicados. Pode, assim, concluir-se que o teste é específico para IgG anti-*Helicobacter pylori*.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Num teste clínico efectuado num laboratório de hospital, analisaram-se 199 soros humanos, 58 dos quais vieram do Departamento de Gastroenterologia. Do total, 138 deram um resultado positivo.

As amostras foram analisadas no ensaio Western Blot, tendo em conta o método de referência.

Resultados

		REFERÊNCIA	
		+	-
Enzywell	+	132	6
	-	1	60

O kit Enzywell *Helicobacter Pylori* IgG resulta em 6 falsos negativos e 1 falso positivo.

A sensibilidade e especificidade foram de 99,2% e 90,9%, respectivamente.

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaios efectuada em três lotes diferentes

Valor directo <i>n=16</i>	Lote N.º 78	Lote N.º 79	Lote N.º 80
<i>D.O.</i>	0,419	0,608	0,6
<i>CV%</i>	12	15	10

Precisão entre passagens

Amostra	AU/ml				
	I passagem	II passagem	III passagem	Média	CV%
PYG1	6,2	7	6,1	6,4	8
PYG2	24,8	26,1	23,9	24,9	4
PYG3	81,3	88,4	84,8	84,8	4









16. SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS	TESTE OU ACCÇÃO
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verifique o procedimento Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no folheto da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dessecante de sílica gel deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de substrato.
	Lavagem inadequada	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
Desenvolvimento inadequado de cor.	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções de utilização recomendadas.
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

17. REFERÊNCIAS

1. Marshall B.J. and Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* i, 1311 (1984).
2. Jones D.M., Lessels A.M., Eldridge J.: Campylobacter-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. *J. Clin. Pathol.* 37: 1002 (1984).
3. Blaser M.J.: H. pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Inf. Dis.* 161: 626 (1990).
4. Valle J., Seppälä K., Sipponen P., Kasanen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of H. pylori: a morphometric study. *Scand. J. Gastroenterology* 26: 1057 (1991).
5. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem.* 22: 1243 (1976).

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbricante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577-587111