

NovaLisa™

Helicobacter pylori

IgG – ELISA



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG-class antibodies against Helicobacter pylori in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur quantitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen Helicobacter pylori in Humanserum oder Plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative des anticorps IgG dirigés contre Helicobacter pylori dans le sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa degli anticorpi della classe IgG per Helicobacter pylori nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cuantitativa de los anticuerpos IgG contra Helicobacter pylori en suero o plasma humano

Teste imunoenzimático para a determinação quantitativa de anticorpos IgG contra Helicobacter pylori em soro ou plasma humano.

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 11
Français:	Page	12 à 16
Italiano:	da Pagina	17 a 21
Espanol:	Página	22 a 26
Português:	Página	27 a 32

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografia	Page / Seite / Page / Pagina / Página	34
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	35
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procedure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ / Pagina / Página	36

Product Number: HELG0220 (96 Determinations)

1. INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a spiral Gram-negative bacterium (2-6.5 µm in size, flagellated) which colonizes the human gastric mucosa. The organism is found in the mucous layer and adheres to the surface mucous epithelium of the stomach but generally does not penetrate the gastric mucosa directly.

However, there is a secondary inflammatory response in the mucosa leading to chronic active gastritis. *Helicobacter pylori* is the primary causative agent in most cases of peptic ulcer disease. Infection rate in Europe is about 30%-40%, worldwide about 50%. There is an inverse relationship between the presence of *Helicobacter pylori* infection and socioeconomic status. In developing countries, people acquire the infection at an early age such that by young adulthood as many as 90% of the population might have *Helicobacter pylori* gastritis. In developed western countries the prevalence of *Helicobacter pylori* gastritis is much lower. Under these conditions, the rate of acquisition is much slower (roughly 1% per annum) and the older one is, the more likely one is to be infected with the organism.

Species	Disease	Mechanism of infection
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis Duodenal and peptic ulcers gastric cancer	The epidemiology of <i>Helicobacter pylori</i> suggests that transmission is via the oral route especially in areas with poor sanitation.

Infection may be identified by

- Histology: Giemsa, Warthin Starry or Genta stain / culture of antral biopsy specimens
- Enzymology: Detection of bacterial urease (urea breath test)
- Serology: Detection of antibodies

A positive antibody test implies active gastritis unless the patient has received a specific anti-*H. pylori* therapy previously. The advantage of serial ELISA testing is that, with prolonged follow up after therapy, patients can be classified as cured if their ELISA levels decrease significantly.

2. INTENDED USE

The NovaTec *Helicobacter pylori* IgG-ELISA is intended for the qualitative and **quantitative** determination of IgG class antibodies against *Helicobacter pylori* in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The quantitative immunoenzymatic determination of IgG-class antibodies against *Helicobacter pylori* is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with *Helicobacter pylori* antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgG conjugate is added. This conjugate binds to the captured *Helicobacter* specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of *Helicobacter* specific IgG antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1 Reagents supplied

- **Helicobacter pylori Coated Wells (IgG):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with *Helicobacter pylori* antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2, coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer for washing the wells; pH 7.2 ± 0.2; white cap.
- **Helicobacter pylori anti-IgG conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled antibodies to human IgG; coloured blue; ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Helicobacter pylori IgG Standards***:** 4 vials, each containing 2ml; ready to use:

Standard A:	0	NTU/ml; blue cap
Standard B:	15	NTU/ml; green cap
Standard C:	75	NTU/ml; yellow cap
Standard D:	150	NTU/ml; red cap

- * contains 0.1 % Bronidox L after dilution
- ** contains 0.2 % Bronidox L
- *** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

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

6. REAGENT PREPARATION

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

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with *Helicobacter pylori* antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. *Helicobacter pylori* anti-IgG Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human IgG horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Standards

The vials labelled with Standard A, B, C and D contain a ready to use standard solution. The concentration of the standards in NovaTec Units (NTU) are:

- Standard A: 0 NTU/ml
- Standard B: 15 NTU/ml
- Standard C: 75 NTU/ml
- Standard D: 150 NTU/ml

The solutions have to be stored at 2...8°C and contain 0.1% Kathon. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2... 8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer will keep for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2 ... 8°C. After first opening stability until expiry date.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well (e.g. A1) for the substrate blank,
4 wells (e.g. B1, C1, etc.) for Standard A, B, C and D.

It is recommended to determine standards and patient samples in duplicate.

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

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

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl of each Standard (A, B, C and D) and diluted samples into the respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content off the wells and wash each well three times with 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100µl Helicobacter pylori anti-IgG Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20 to 25°C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 to 25°C) in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader to zero using the substrate blank in well A1.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at 450 nm and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Assay validation criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance < **0.100**.
- **Standard A** in B1: Absorbance < **0.200**
- **Standard B** in C1: Absorbance > **0.200**
- **Standard C** in D1: Absorbance > **0.500**
- **Standard D** in E1: Absorbance > **1.100**

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

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

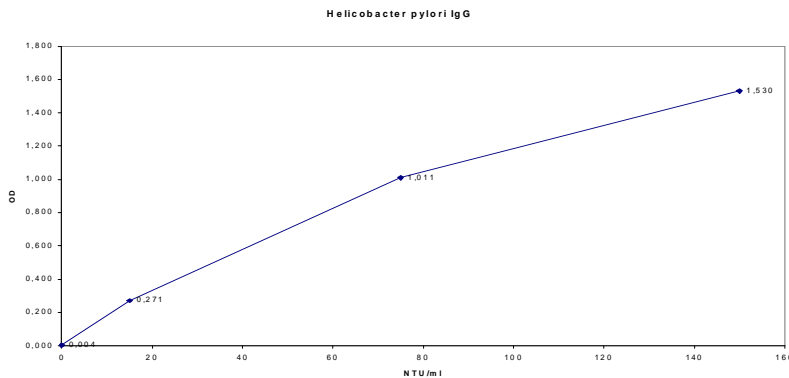
9.2. Calculation of Results

In order to obtain **quantitative results in NTU/ml** blot the (mean) absorbance values of the 4 Standards A, B, C and D on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0, 15, 75 and 150 NTU/ml) and draw a standard calibration curve (absorbance values on the vertical y-axis, concentrations on the horizontal x-axis).

Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each patient specimen and control.

All suitable computer programs available can be used for automated result reading and calculation.

9.3. Typical Calibration Curve



9.4. Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own patient populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

- Reactive** > 20 NTU/ml
- Grey zone (equivocal):** 15 - 20 NTU/ml
- Non reactive:** < 15 NTU/ml

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean	Cv (%)	Cv (%) mean
Pos Serum	13	1.3	7.2	5.1
	13	3.7	3.0	
Intraassay	n	Mean	Cv (%)	Cv (%) mean
Pos Serum	19	0.56	6.1	6.5
	19	1.50	7.0	

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 92.0% (95% confidence interval 0.84 – 0.99).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 94.4 % (95% confidence interval 0.87 – 1).

10.4. Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity is defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator. It is 3 NTU/ml.

10.5. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

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

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromized patients and newborns serological data only have restricted value.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

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

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: HELG0220 Helicobacter pylori IgG-ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, mikroaerophiles Stäbchenbakterium, das die menschliche Magenschleimhaut besiedelt. Es besitzt eine spiralige, leicht gekrümmte Form und hat an seinem Ende Geißeln, mit denen es sich schnell fortbewegen kann. Biochemisch ist die hohe Aktivität des Enzyms Urease bemerkenswert. Neben der wichtigsten Spezies Helicobacter pylori kommen beim Menschen noch H. cinaedi und H. fenelliae vor. H. cinaedi und fenelliae sind jedoch nicht im Magen, sondern in distalen Darmabschnitten als Enteritiserreger zu finden. Bei Tieren wurden noch weitere Arten beschrieben.

H. pylori gilt als eine Ursache für die Antrungastritis (Typ B-Gastritis) und als Wegbereiter für das Ulcus duodeni und ventriculi. Bei chronischer Besiedlung droht eventuell ein Magenkarzinom.

In den Industriestaaten ist die Infektion mit H. pylori weit verbreitet. Pro Altersjahrgang nimmt die Prävalenz um ca. 1 % zu, so dass etwa die Hälfte der 50-jährigen dies Bakterien in der Magenschleimhaut hat, ohne dass dies immer gleich zu einer manifesten Erkrankung führt. In Ländern mit schlechtem Hygienestandard ist die Prävalenz noch höher. Die Übertragung der Erreger erfolgt scheinbar auf oralem Weg nur von Mensch zu Mensch.

Spezies	Erkrankung	Symptome	Infektionsmodus
Helicobacter pylori	Gastritis Ulcus duodeni und ventriculi Magenkarzinom	evtl. asymptomatisch diffuse Abdominalbeschwerden, meist im Oberbauch Magendrücken, -schmerzen, Unverträglichkeit von Speisen Mundgeruch	oral, von Mensch zu Mensch

Infektionen können nachgewiesen werden mittels:

- Histologie von Magenschleimhautbiopsien
- Enzymologie: Nachweis bakterieller Urease (Urease-Schnelltest, Atemtest)
- Serologie: Nachweis spezifischer Antikörper mittels ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Helicobacter pylori IgG-ELISA ist für den quantitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen Helicobacter pylori in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die quantitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen Helicobacter pylori beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit inaktivierten Helicobacter pylori Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP) -konjugierte anti-human-IgG Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Helicobacter pylori beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit inaktivierten Helicobacter pylori Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe,
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):***: 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2±0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Helicobacter pylori anti-IgG-Konjugat**:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG; blau gefärbt; gebrauchsfertig. schwarze Verschlusskappe;
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Helicobacter pylori IgG Standards***:** 4 Fläschchen, je 2 ml, gebrauchsfertig,;

Standard A:	0	NTU/ml; blaue Verschlusskappe
Standard B:	15	NTU/ml; grüne Verschlusskappe
Standard C:	75	NTU/ml; gelbe Verschlusskappe
Standard D:	150	NTU/ml; rote Verschlusskappe

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur(20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktivierten *Helicobacter pylori* Antigenen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. *Helicobacter pylori* anti-IgG Konjugat

Das Fläschchen enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgG-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Standards

Die Fläschchen mit Nullstandard A und Standards B, C und D enthalten 2.0 ml gebrauchsfertige Standardlösung. Die Konzentrationen der Standards in NovaTec Units (NTU) sind:

Standard A: 0 NTU/ml

Standard B: 15 NTU/ml

Standard C: 75 NTU/ml

Standard D: 150 NTU/ml

Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

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

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung (z.B. A1) für den Substratleerwert (Blank),
4 Vertiefungen (z.B. B1, C1, etc) für die Standards A, B, C und D.

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Standards und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen. Es wird empfohlen positive bzw. negative Kontrollproben bei jeder Testdurchführung mitzuführen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µl Standard A, B, C und D und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
 2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
 3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
 4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
- Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*
5. 100µl Helicobacter pylori anti-IgG Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
 6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
 7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
 8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
 9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
 10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*

Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgG-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.

11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

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

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

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der vier Standards und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

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

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

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0.100**
- **Standard A** in B1: Extinktion < **0.200**
- **Standard B** in C1: Extinktion > **0.200**
- **Standard C** in D1: Extinktion > **0.500**
- **Standard D** in E1: Extinktion > **1.100**

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

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

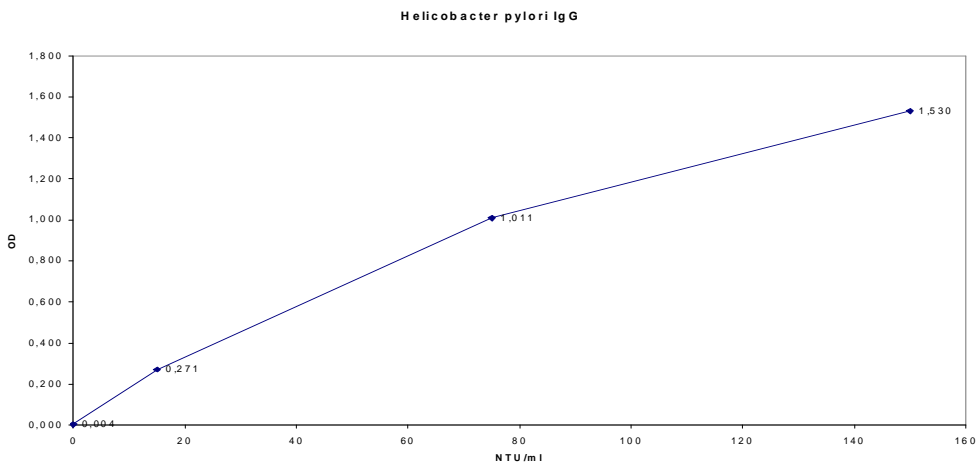
9.2. Messwertberechnung

Um **quantitative Ergebnisse in NTU/ml** zu erhalten, die Extinktionswerte der vier Standards A, B, C, und D gegen ihre entsprechende Konzentration (0, 15, 75, 150 NTU/ml) auftragen und eine Standardkurve erstellen (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

Anhand dieser Standardkurve Ergebnisse die gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen Patientenproben ablesen.

Im Handel erhältliche Auswertungsprogramme ermöglichen eine automatische Erstellung der Standardkurve und Kalkulation der Ergebnisse

9.2.1 Typische Standardkurve



9.3. Interpretation der Ergebnisse

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

Folgende Angaben gelten als Richtlinien:

- Reaktiv:** >20 NTU/ml
Grauzone: 15 – 20 NTU/ml
Nicht-reaktiv: <15 NTU/ml

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Vk (%)</u>	<u>Vk (%) Mittelwert</u>
Pos. Serum	13	1,3	7,2	5,1
	13	3,7	3,0	
<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Vk (%)</u>	<u>Vk (%) Mittelwert</u>
Pos. Serum	19	0,56	6,1	6,5
	19	1,50	7,0	

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 92,0 % (95% Konfidenzintervall 0,84 – 0,99).

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 94,4 % (95% Konfidenzintervall 0,87 – 1).

10.4. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Tests ist definiert als die kleinste Konzentration, die vom Nullstandard unterschieden werden kann. Sie beträgt 3 NTU/ml.

10.5. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

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

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

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

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

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: HELG0220 Helicobacter pylori IgG-ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUCTION

Les bactéries *Helicobacter pylori* sont des bactéries Gram-négatives en spirale (2-6.5 µm de longueur, avec des flagelles) qui colonisent la muqueuse gastrique humaine. L'organisme se trouve dans la couche muqueuse et adhère à la surface de l'épithélium de la muqueuse gastrique, mais généralement il ne la pénètre pas directement.

Cependant, il y a une réponse inflammatoire secondaire dans la muqueuse, qui mène à la gastrite chronique active. *Helicobacter pylori* est l'agent principal de la plupart des cas d'ulcères d'estomac. Le taux d'infection en Europe est d'environ 30%-40%, et d'environ 50% dans le monde entier. Il y a un rapport inverse entre la présence de l'infection d'*Helicobacter pylori* et le statut socio-économique. Dans les pays en voie de développement, les gens acquièrent l'infection à un jeune âge, de sorte que jusqu'à 90% des jeunes adultes pourrait avoir une gastrite à *Helicobacter pylori*. Dans les pays occidentaux développés, la prévalence de la gastrite à *Helicobacter pylori* est de loin inférieure. Dans ces conditions, le taux d'acquisition est beaucoup plus lent (à peu près 1% par an) et plus on est âgé, plus on est susceptible à l'infection.

Espèce	Maladie	Mécanisme de l'infection
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite, ulcères duodénaux et ulcères d'estomac, cancer gastrique	L'épidémiologie d' <i>Helicobacter pylori</i> suggère que la transmission se produit par la voie orale, particulièrement dans des régions avec faible niveau d'hygiène.

L'infection peut être identifiée par

- Histologie : colorant de Giemsa, Warthin Starry ou Genta ; culture d'échantillons de biopsie gastrique
- Enzymologie : Détection d'uréase bactérienne (« test respiratoire à l'urée »)
- Sérologie : Détection des anticorps

Un test positif d'anticorps indique une gastrite active à moins que le patient ait reçu avant une thérapie d'éradication d'*Helicobacter pylori*. L'avantage des tests ELISA répétés est que des examens de contrôle après la thérapie permettent de classer des patients comme guéris si leurs résultats en ELISA diminuent de manière significative.

2. INDICATIONS D'UTILISATION

La trousse *Helicobacter pylori* IgG ELISA de NovaTec est prévue pour la détermination **quantitative** des anticorps IgG anti-*Helicobacter pylori* dans le sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination immunoenzymatique quantitative des anticorps IgG anti-*Helicobacter pylori* est basée sur la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes d'*Helicobacter pylori*, pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, le conjugué anti-IgG humaines marquées à la peroxydase du raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés spécifiques de l'*Helicobacter pylori*. Le complexe immun constitué par le conjugué lié est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifiques d'*Helicobacter pylori* dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une coloration jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Puits revêtus d'*Helicobacter pylori* (IgG)** : 12 barrettes de 8 puits sécables revêtues d'antigène d'*Helicobacter pylori* ; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant pour échantillon IgG ***** : 1 flacon contenant 100 ml de tampon pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon blanc.
- **Solution d'arrêt** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à l'emploi ; bouchon rouge.
- **Solution de lavage (concentrée x 20) *** : 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon concentré 20 fois (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; bouchon blanc.
- **Conjugué IgG anti-*Helicobacter pylori***** : 1 flacon contenant 20 ml d'anticorps de lapin anti-IgG humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort ; prêt à l'emploi ; couleur bleue, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi ; bouchon jaune.
- **Étalons *Helicobacter pylori* IgG ***** : 4 flacons, contenant chacun 2 ml ; prêt à l'emploi:

Étalon A:	0	NTU/ml; bouchon bleu
Étalon B:	15	NTU/ml; bouchon vert
Étalon C:	75	NTU/ml; bouchon jaune
Étalon D:	150	NTU/ml; bouchon rouge

- * contient 0.1 % de Bronidox L après dilution
- ** contient 0.2 % de Bronidox L
- *** contient 0.1 % de Kathon

4.2. Matériaux fournis

- 1 support de bande
- 1 couvercle autocollant
- 1 notice d'emploi
- 1 plan de distribution et d'identification

4.3. Matériel et équipement requis

- lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre le 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (fraîchement) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'échéance indiquée sur l'étiquette une fois stockés à +2... +8°C.

6. PREPARATION DE REACTIF

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient à température ambiante (+20... + 25°C) avant de commencer le dosage !

6.1. Barrettes revêtues sécables

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène d'*Helicobacter pylori* et sont prêtes à l'emploi. Conserver à +2... +8°C. *Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à +2... +8°C; stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué IgG anti-*Helicobacter pylori*

Le flacon contient 20 ml d'une solution d'anti-IgG humaines avec de la peroxydase du raifort, un tampon, des stabilisants, des conservateurs et un colorant bleue inerte. La solution est prête à l'emploi. Conserver à +2... +8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2... +8°C.*

6.3. Etalons

Les flacons des étalons contiennent une solution étalon prête à l'emploi. La concentration des étalons en NovaTec Units (NTU) est :

Etalon A: 0 NTU/ml
Etalon B: 15 NTU/ml
Etalon C: 75 NTU/ml
Etalon D: 150 NTU/ml

Les solutions doivent être conservées à +2... +8°C et contiennent 0.1% de Kathon. *Après la première utilisation, la solution reste stable*

6.4. Diluant pour échantillon IgG

Le flacon contient 100 ml d'un tampon phosphaté, des stabilisants, des conservateurs et un colorant jaune inerte. Il est utilisé pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prête à l'emploi doit être conservée à +2... +8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2... +8°C.*

6.5. Solution de lavage (20x conc.)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. *Le tampon dilué est stable pendant cinq jours si conservé à +2...+8°C. Le tampon concentré reste stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé à +2...+8°C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat de TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2... +8°C, à l'abri de la lumière. *La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2... +8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à +2... +8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2... 8°C.*

7. PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Utiliser des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à +2... +8°C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.*

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués au 1/101^{ème} avec le diluant pour échantillon IgG.

Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml du diluant pour échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution au 1/101^{ème} et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCEDURE DE DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur la feuille fournie dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des étalons. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins :

1 puits (par exemple A1) pour le blanc substrat,
4 puits (par exemple B1, C1, etc.) pour les étalons

Il est conseillé de déterminer les étalons et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipeter 100 µl d'étalon (A, B, C et D) et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape !
5. Pipeter 100 µl du conjugué IgG anti-Helicobacter pylori dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.** *Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.*
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**
10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB.

La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.

Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec du sérum physiologique, par exemple au 1/2. Ensuite diluer l'échantillon au 1/101^{ème} avec le tampon et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.

11. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc substrat dans le puits A1.

Si - pour raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.

Calculer les **valeurs moyennes d'absorbance** pour tous les doublets, si nécessaire.

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0.100**.
- **Etalon A** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0.200**.
- **Etalon B** dans C1 : Valeur d'absorbance > **0.200**
- **Etalon C** dans D1 : Valeur d'absorbance > **0.500**
- **Etalon D** dans E1 : Valeur d'absorbance > **1.100**

Etalon A < Etalon B < Etalon C < Etalon D

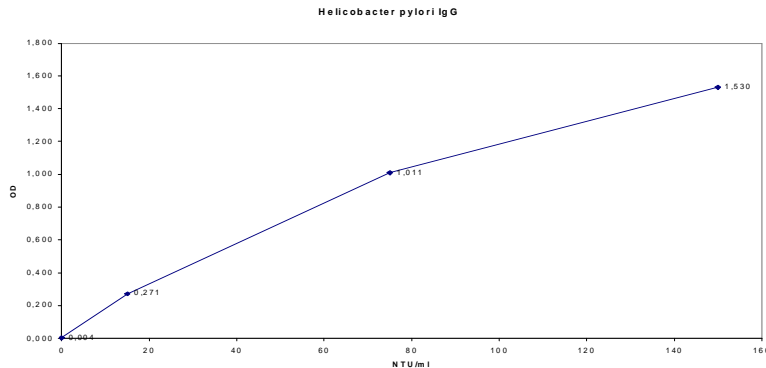
Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des **résultats quantitatifs en NTU/ml**, tracer une courbe d'étalonnage en inscrivant les valeurs (moyennes) d'absorbance des 4 étalons A, B, C et D, en ordonnées, par rapport aux concentrations correspondantes (0, 15,75 et 150 NTU/ml), en abscisses, sur du papier millimétré en coordonnées linéaires.

Lire les résultats dans cette courbe d'étalonnage en utilisant les valeurs (moyennes) d'absorbance de chaque échantillon et de chaque contrôle. Tous les programmes informatiques appropriés peuvent être utilisés pour la lecture et le calcul automatiques des résultats.

9.3. Courbe d'étalonnage typique



9.4. Interprétation des résultats

Des intervalles des valeurs normales devraient être établis, pour ce dosage ELISA, par chaque laboratoire en prenant en compte la population de patients et les variations géographiques.

Les valeurs suivantes devraient être considérées comme directives :

- Réactif** > 20 NTU/ml
- Zone grise (équivoque) :** 15 - 20 NTU/ml
- Non réactif :** < 15 NTU/ml

10. PERFORMANCES DU DOSAGE

10.1. Précision

<u>Inter-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>	<u>moyenne CV (%)</u>
Sérum pos.	13	1.3	7.2	5.1
	13	3.7	3.0	

<u>Intra-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>	<u>moyenne CV (%)</u>
Sérum pos.	19	0.56	6.1	6.5
	19	1.50	7.0	

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est de 92.0 % (95% intervalle de confiance 0.84 – 0.99).

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est de 94.4 % (95% intervalle de confiance 0.87 – 1).

10.4. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique est définie comme la concentration apparente de l'analyte pouvant être distinguée de l'étalon zéro. Elle est de 3 NTU/ml.

10.5. Interférence

Aucune interférence n'a été observée sur des sérums hémolytiques, lipémiques ou ictériques pour des concentrations allant jusqu'à 10 mg/ml d'hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0.2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation-décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorbance. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'historique clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : A la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique en cas de contact avec la peau et les muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

12.1. Mesures d'élimination

Les résidus de réactifs et des préparations sont considérés comme de déchets potentiellement dangereux. L'élimination de ces déchets est soumise à des réglementations nationales et locales. Contacter les autorités locales ou les sociétés spécialisées pour obtenir des conseils sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence du Produit : HELG0220 Helicobacter pylori IgG-ELISA (96 déterminations)

1. INTRODUZIONE

L'*Helicobacter pylori* è un batterio spiraliforme gram negativo, che si introduce nella mucosa dello stomaco degli essere umani. È mobile per la presenza di flagelli di superficie localizzati sull'estremità polare. La trasmissione può avvenire in diversi modi: oro-orale, gastro-orale ed oro-fecale. L'*Helicobacter pylori* è associato alla gastrite cronica ed all'ulcera peptica. Può essere riscontrato anche in soggetti asintomatici. Il batterio è adeso alla superficie della mucosa gastrica ed immerso nel muco: attraverso i flagelli e la produzione di ureasi può indurre una lesione infiammatoria cronica a livello della mucosa gastro-duodenale. L'infezione cronica da *H. pylori* è stata anche chiamata in causa nella patogenesi del carcinoma e del linfoma gastrico. L'*H. pylori* viene trovato nel 10% dei soggetti di età compresa tra i 20-30 anni e in circa il 50% delle persone di età compresa tra i 60-70 anni.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite, Ulcera peptica, Carcinoma	Dolori addominali, fetor oris	Trasmissione: orale; contatto diretto con una persona infetta

Diagnosi

- Histologia,
- Test enzimatico (Ureasi)
- Sierologia: ELISA

2. USO PREVISTO

Il NovaTec *Helicobacter pylori* IgG ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per *Helicobacter pylori* nel siero o plasma (cittrato) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione quantitativa degli anticorpi IgG per *Helicobacter pylori* si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici del *Helicobacter pylori*. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgG umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il *Helicobacter pylori* di classe IgG presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni del *Helicobacter pylori* (IgG):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni del *Helicobacter pylori*; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG***:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato *Helicobacter pylori* anti IgG**:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgG umani, coniugati a perossidasi; color azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- ***Helicobacter pylori* IgG Standards***:** 5 flaconi, contenenti 2 ml, pronti all'uso:

Standard A:	0	NTU/ml; tappo blu
Standard B:	15	NTU/ml; tappo verde
Standard C:	75	NTU/ml; tappo giallo
Standard D:	150	NTU/ml; tappo rosso

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati del *Helicobacter pylori*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.2. Coniugato *Helicobacter pylori* IgG

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgG umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte azzurro. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.3. Standards

I flaconi contengono 2,0 ml di soluzione Standard pronta all'uso con le seguenti concentrazioni in NovaTec Units (NTU):

Standard A: 0 NTU/ml

Standard B: 15 NTU/ml

Standard C: 75 NTU/ml

Standard D: 150 NTU/ml

Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.4. Tampone diluente IgG

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (citrato) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente IgG. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto (es. A1) per il bianco-substrato (blank)
4 pozzetti (z.B. B1, C1, etc) per gli Standards A, B, C und D.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.

5. Pipettare 100 µl di Coniugato Helicobacter pylori anti-IgG in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20° ... 25°C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20° ... 25°C) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgG. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) in **A1**. *Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.*

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- | | | |
|---------------------------|--------|---------------------------|
| ▪ Substrato bianco | in A1: | Assorbanza < 0.100 |
| ▪ Standard A | in B1: | Assorbanza < 0.200 |
| ▪ Standard B | in C1: | Assorbanza > 0.200 |
| ▪ Standard C | in D1: | Assorbanza > 0.500 |
| ▪ Standard D | in E1: | Assorbanza > 1.100 |

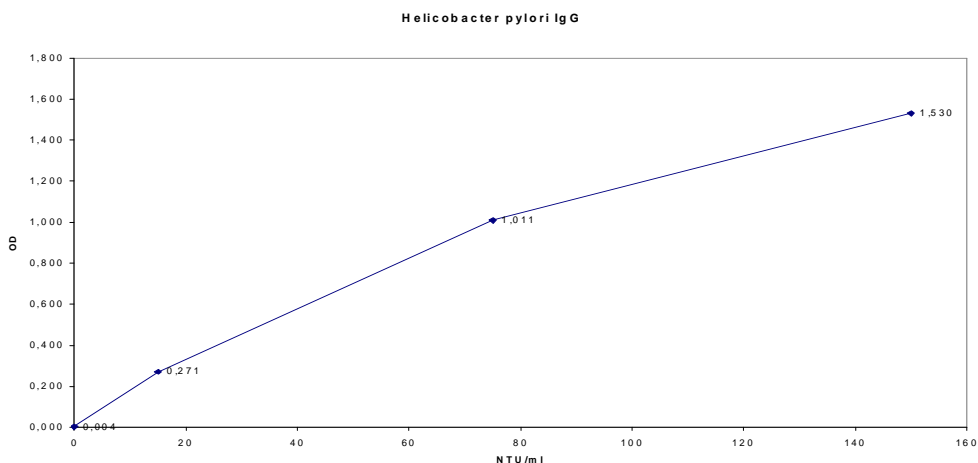
Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Per ottenere i **risultati quantitativi in NTU/ml**, realizzare un diagramma cartesiano ponendo le assorbanze degli Standards A, B, C, e D sull'asse della Y e ponendo le concentrazioni (0, 15, 75, 150 NTU/ml) sull'asse della X su cui tracciare la curva standard. Traendo i risultati da questa curva standard vanno inseriti i valori medi delle assorbanze dei campioni di ogni singolo paziente. Tutti i programmi per computer commercializzati sono utilizzabili per calcolare ed interpretare i risultati.

9.2.1 Tipica curva standard



9.3. Interpretazione dei risultati

Gli intervalli in cui i valori sono normali per questo ELISA devono essere stabiliti da ogni singolo laboratorio basandosi sulla loro popolazione relativa all'area geografica di competenza.

I seguenti risultati possono considerarsi indicativi:

Reattivo: >20 NTU/ml

Dubbio: 15 – 20 NTU/ml

Non-reattivo: <15 NTU/ml

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

Interdosaggio	n	Media (NTU/ml)	Cv (%)	Media Cv (%)
Siero pos.	13	1.3	7.2	5.1
	13	3.7	3.0	
Intradossaggio	n	Media	CV (%)	Media Cv (%)
Siero pos.	19	0.56	6.1	6.5
	19	1.50	7.0	

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a 92.0 % (95% intervallo di confidenza 0.84 – 0.99).

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è pari a 94.4 % (95% intervallo di confidenza 0.87 – 1).

10.4. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del test è definita dalla concentrazione più piccola che può essere distinta dallo standard A. Essa equivale a 3 NTU/ml.

10.5. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.
--

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.
--

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: HELG0220 Helicobacter pylori IgG-ELISA (96 determinazioni)

1. INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* es un baston gram negativo, microaerófilo que coloniza la mucosa gástrica. Se manifiesta con forma curvada o espiral con flagelos en un extremo que le confieren una gran movilidad. Bioquímicamente notable es la alta actividad de la enzima ureasis. Aparte de la especie más importante *Helicobacter pylori*, se conocen en el hombre además *H. cinaedi* y *H. fenelliae* que no habitan en el estómago pero sí en partes distales del intestino causando enteritis. En animales están descritas varias especies más.

El *H. pylori* se considera como la causa de la gastritis del antrum (tipo B) y como precursor del úlcus duodeni y ventrículo. Una colonización crónica puede derivar en un carcinoma gástrico.

La infección es muy común en los países industrializados. Con cada año de edad la prevalencia aumenta por aprox. 1 % así que la mitad de las personas de 50 años lo tienen en la mucosa gástrica sin que obligatoriamente lleve a una enfermedad. En países con menor estándar higiénico la prevalencia es más alta. La transmisión del patógeno es probablemente por vía oral, existiendo solamente entre humanos.

Especies	Enfermedad	Síntomas	Vía de transmisión
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis, úlcus duodeni y ventrículo, carcinoma gástrica	A veces asintomático, problemas difusos del abdomen, sobre todo epigástrico, dolores estomacales, intolerancia de alimentos, hálito	Oral, de hombre a hombre

Infecciones pueden ser detectadas por:

- Histología de biopsias de la mucosa gástrica
- Enzimología: Detección de ureasis bacterial (prueba rápida de ureasis, prueba del aliento)
- Serología: Detección de anticuerpos específicos a través de ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima de Nova Tec es para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Helicobacter pylori* en suero o plasma (citratado) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cuantitativa de anticuerpos específicos contra *Helicobacter pylori* se basa en la técnica del ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de *Helicobacter pylori*. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmobilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgG anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgG) recubiertas de antígeno de *Helicobacter pylori*:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertas con antígenos de *Helicobacter pylori*, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgG de la muestra***:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.)*:** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado IgG anti-humano (*Helicobacter pylori*)**:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgG anti-humano con peroxidasa; color azul; tapa negra.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Soluciones IgG de estándar (*Helicobacter pylori*)***:** 5 botellas de 2 ml, listas para ser utilizadas:
 Estándar A: 0 NTU/ml; tapa azul
 Estándar B: 15 NTU/ml; tapa verde
 Estándar C: 75 NTU/ml; tapa amarilla
 Estándar D: 150 NTU/ml; tapa roja

* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir

** contiene 0.2% Bronidox L

*** contiene 0.1% Catón

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!

6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de *Helicobacter pylori*. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2. Conjugado de IgG anti-humano (*Helicobacter pylori*)

La botella contiene 20ml de una solución de IgG anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante azul inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.

6.3. Estandar

Las botellas de estándar cero A y estándar B, C, y D contienen 2.0 ml solución de estándar lista para ser utilizada. Las concentraciones en unidades Novatec (NTU) son:

Estandar A: 0 NTU/ml

Estandar B: 15 NTU/ml

Estandar C: 75 NTU/ml

Estandar D: 150 NTU/ml

Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado entre 2...8°C.*

6.4. Tampón de dilución de IgG para la muestra

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante amarillo inerte. La solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgG, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(e.G. A1)	para el blanco,
4 pocillos	(e.G. B1, C1)	para los estándares A, B, C y D

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente. Se recomienda de llevar pruebas de control positivo o negativo con cada ensayo. Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

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

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$

1. Pipetear 100 µl de estándares y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h ± 5 min a 37°C**.
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el resto del líquido de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

Ojo: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!

5. Pipetar 100µl de conjugado anti-IgG (Helicobacter pylori) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C). Evitar la luz solar directa.**
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C).**
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgG 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

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

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

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

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Estandar A** en B1 extinción < **0.200**
- **Estandar B** en C1 extinción > **0.200**
- **Estandar C** en D1 extinción > **0.500**
- **Estandar D** en E1 extinción > **1.100**

Estandar A < Estandar B < Estandar C < Estandar D

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

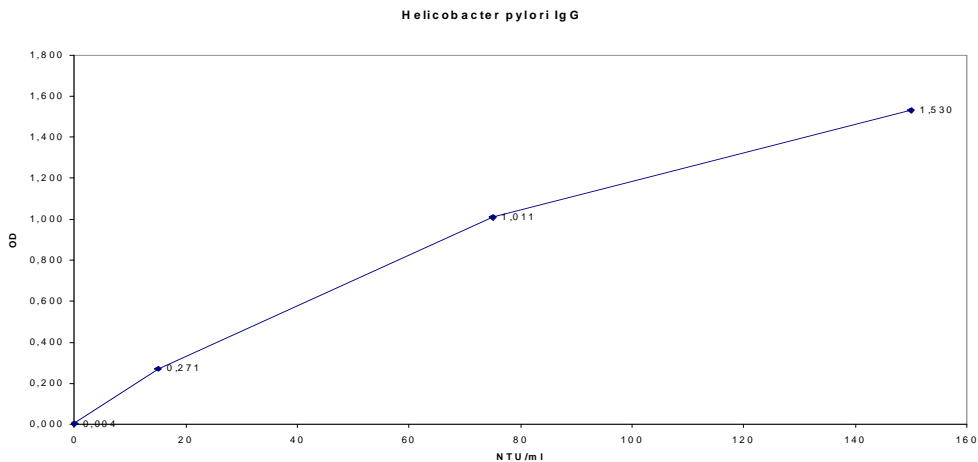
9.2. Calculo del valor de la medición

Para obtener resultados cuantitativos en NTU/ml se tiene que establecer una curva estandar con los valores de extinción (eje y) de los 4 estandars A, B, C y D contra sus respectivas concentraciones (0, 15, 75, 155 NTU/ml) (eje x).

Con esta curva estandar se pueden ver los resultados por el promedio de las extinciones de las pruebas de los pacientes.

Existen programas comercializados que posibilitan un cálculo automatico de curvas estandar y de los resultados.

9.2.1 Curva de estandar típica



9.3. Interpretación de los resultados

Las normas para los resultados del ELISA tienen que estar establecidas con el colectivo respectivo de los pacientes en el área del laboratorio.

Estos son los datos normativos

Reactivo: >20 NTU/ml
Zona intermedia: 15 – 20 NTU/ml
No-reactivo: <15 NTU/ml

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

<u>Intra ensayo</u>	<u>n</u>	<u>Promedio</u>	<u>CV (%)</u>	<u>CV (%) Promedio</u>
Serum pos.	13	1.3	7.2	5.1
	13	3.7	3.0	

<u>Inter ensayo</u>	<u>n</u>	<u>Promedio</u>	<u>CV (%)</u>	<u>CV (%) Promedio</u>
Serum pos.	19	0.56	6.1	6.5
	19	1.50	7.0	

10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Es de 92.0 % (95% intervalo de confianza 0.84 – 0.99).

10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es de 94.4 % (95% intervalo de confianza 0.87 – 1).

10.4. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del ensayo esta definida como la concentración más pequeña que se puede distinguir del estandar cero. Esta es de 3 NTU/ml.

10.5. Interferencias

Las muestras hemolítico, lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 10 mg/ml para hemoglobina, 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

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

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

ADVERTENCIA: Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

ADVERTENCIA: El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: HELG0220 Helicobacter pylori IgG-ELISA (96 determinaciones)

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa em espiral (2-6.5 µm de comprimento, com flagelos) que coloniza a mucosa gástrica humana. A bactéria encontra-se na camada mucosa e adere à superfície do epitélio da mucosa gástrica, mas geralmente não a penetra directamente. Contudo, há uma resposta inflamatória secundária na mucosa, que conduz a uma gastrite crónica activa. O *Helicobacter pylori* é o agente principal da maior parte dos casos de úlceras do estômago. A taxa de infecção na Europa é de cerca de 30%-40%, e de cerca de 50% em todo o mundo. Há uma relação inversa entre a presença da infecção com *Helicobacter pylori* e o estatuto sócio-económico. Em países em via de desenvolvimento, as pessoas contraem a infecção numa idade jovem, de tal modo que cerca de 90% dos jovens adultos poderão ter uma gastrite de *Helicobacter pylori*. Nos países ocidentais desenvolvidos, a prevalência da gastrite *Helicobacter pylori* é muito inferior. Em certas condições, a taxa de aquisição é muito mais lenta (muito perto de 1% ao ano) e quanto mais idade se tem, mais se é susceptível à infecção.

Espécies	Doenças	Mecanismo da infecção
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite Úlceras duodenais e estomacais Cancro do estômago	A epidemiologia do <i>Helicobacter pylori</i> sugere que a transmissão se faz por via oral, particularmente nas regiões com baixo nível sanitário.

A infecção pode ser identificada por

- Histologia: Corante de Giemsa, Warthin Starry ou Genta / cultura de amostras de biopsia gástrica
- Enzimologia: Detecção de urease bacteriana (teste respiratório da ureia).
- Serologia: Detecção de anticorpos

Um teste positivo de anticorpos indica uma gastrite activa a não ser que o paciente tenha recebido anteriormente uma terapia de erradicação do *H. pylori*. A vantagem dos testes ELISA repetidos é que os exames de controlo após a terapia permitem dar como curados os doentes, se os seus resultados com os testes ELISA diminuírem de forma significativa.

2. USO PREVISTO

A NovaTec *Helicobacter pylori* IgG-ELISA é um kit para a determinação qualitativa e quantitativa dos anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori* no soro humano ou plasma (citrato).

3. PRINCIPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática quantitativa dos anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori* é baseada na técnica ELISA (imunoensaio enzimático). Os Poços da microplaca são revestidos com antígenos de *Helicobacter pylori* para ligarem os anticorpos correspondentes da amostra. Após a lavagem das tiras para eliminar os restos da amostra não ligada, ao conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase de rábano (HRP) é adicionado. Este conjugado liga-se aos anticorpos específicos do *Helicobacter* capturados. O imuno-complexo constituído pelo conjugado ligado é visualizado acrescentando-se o substrato de Tetrametilbenzidina (TMB) que dá um produto de reacção de cor azul.

A intensidade da cor deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos IgG específicos do *Helicobacter* na amostra do doente. Acrescenta-se ácido sulfúrico para parar a reacção, o que produz uma cor amarela. A absorvância a 450 nm determina-se utilizando um leitor de microplacas ELISA.

4. MATERIAL

4.1 Reagentes fornecidos

- **Poços revestidos de *Helicobacter pylori* (IgG):** 12 tiras de 8 poços separáveis, revestidas com antígenos de *Helicobacter pylori*; em saquetas de alumínio com fecho.
- **Diluinte para amostra IgG ***:** 1 frasco, contendo 100 ml de tampão para diluição da amostra; pH 7.2 ± 0.2, de cor amarela; pronto a usar; de tampa branca.
- **Solução de paragem:** 1 frasco, contendo 15 ml de ácido sulfúrico 0.2 mol/l; pronto a usar; tampa vermelha.
- **Solução de lavagem (concentrada x20)*:** 1frasco, contendo 50 ml dum tampão concentrado 20 vezes para lavar as tiras; pH 7.2 ± 0.2; tampa branca.
- **Conjugado anti-IgG *Helicobacter pylori* **:** 1 frasco, contendo 20 ml de anticorpos anti-IgG humanos marcados com peroxidase; cor azul; pronto a usar; tampa preta.
- **Solução de substrato TMB:** 1 frasco, contendo 15 ml de 3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine (TMB); pronto a usar; tampa amarela.
- **Calibradores *Helicobacter pylori* IgG ***:** 4 frascos, contendo cada um 2 ml; pronto a usar:

Calibrador A:	0	NTU/ml; tampa azul
Calibrador B:	15	NTU/ml; tampa verde
Calibrador C:	75	NTU/ml; tampa amarela
Calibrador D:	150	NTU/ml; tampa vermelha

*	contém	0.1 % de Bronidox L após diluição
**	contém	0.2 % de Bronidox L
***	contem	0.1% de Kathon

4.2. Materiais fornecidos

- 1 Suporte de tiras
- 1 Películas adesivas
- 1 Instruções de utilização
- 1 Plano de distribuição e identificação

4.3. Material e equipamento requerido

- Leitor de microplacas ELISA, para medir a absorvância a 450/620nm.
- Incubador a 37°C
- Equipamento manual ou automático para lavagem de poços
- Pipetas para utilização entre 10 e 1000 µl
- Misturador Vortex
- Água desionizada ou (recentemente) destilada
- Tubos descartáveis
- Cronómetro

5. ESTABILIDADE E CONSERVAÇÃO

Os reagentes são estáveis até à data de validade indicada no rótulo desde que conservados a 2...8 °C.

6. PREPARAÇÃO DO REAGENTE

É muito importante que todos os reagentes, amostras e standards estejam à temperatura ambiente (20...25°C) antes de começar o ensaio !

6.1. Tiras revestidas separáveis

As tiras separáveis são revestidas de antígenos de *Helicobacter pylori* e estão prontas a ser utilizadas. Conservar a 2...8°C. *Guardar imediatamente as tiras não utilizadas na saqueta de alumínio com sílica desumidificante e conservá-las a 2...8 °C; estabilidade até ao fim da data de validade.*

6.2. Conjugado anti-IgG *Helicobacter pylori*

O frasco contém 20 ml duma solução de anti-IgG humano com o peroxidase de rábano, um tampão, estabilizantes, conservantes e um corante azul inerte. A solução está pronta a ser utilizada. Conservar a 2...8°C. *Após a primeira utilização, a solução fica estável até à data de validade, se for conservada a 2...8°C.*

6.3. Calibradores

Os frascos rotulados com Standard A, B, C e D contêm uma solução pronta a ser usada. A concentração dos calibradores em unidades NovaTec (NTU) é:

Calibrador A: 0 NTU/ml
 Calibrador B: 15 NTU/ml
 Calibrador C: 75 NTU/ml
 Calibrador D: 150 NTU/ml

As soluções devem ser conservadas a 2...8°C e contêm 0.1% de Kathon. *Após a primeira utilização, a solução permanece estável.*

6.4. Diluente para amostra IgG

O frasco contém 100 ml dum tampão fosfatado, estabilizantes, conservantes e um corante amarelo inerte. É utilizado para a diluição da amostra do doente. Esta solução pronta a ser usada deve ser conservada a 2... 8°C. *Após a primeira utilização, a solução permanece estável até à data de validade, se for conservada a 2...8°C.*

6.5. Solução de lavagem (20xconc.)

O frasco contém 50 ml dum tampão concentrado, detergentes, estabilizantes e conservantes. Diluir a solução de lavagem a 1+19; por exemplo 10 ml da solução de lavagem + 190 ml de água bidestilada recente e não contaminada. O tampão diluído é estável durante 5 dias se conservado à temperatura ambiente. *Cristais na solução desaparecem aquecendo a 37 °C em banho-maria. Após a primeira utilização o concentrado é estável até à data de validade.*

6.6. Solução de substrato de TMB

O frasco contém 15 ml de uma mistura de peróxido de hidrogénio e de tetrametilbenzidina. O reagente está pronto a ser usado e deve ser conservado a 2...8°C, ao abrigo da luz. A solução deve ser incolor ou ter um leve tom azulado. *Se o substrato ficar azul, pode ter sido contaminado e deve ser substituído. Após a primeira utilização, a solução permanece estável até à data de validade se for conservada a 2...8°C.*

6.7. Solução de paragem

O frasco contém 15 ml de uma solução de ácido sulfúrico 0.2 M (R 36/38, S 26). Esta solução está pronta a ser empregue e deve ser conservada a 2...8°C. Após a primeira utilização, a solução permanece estável até ao final do prazo de validade.

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Utilizar amostras de soro humano ou plasma (citrato) para esta análise. Se o teste for efectuado nos 5 dias seguintes à colheita das amostras, estas deverão ser conservadas a 2...8°C; de outro modo aliquotadas e conservadas congeladas (-20 to -70°C). Se as amostras forem conservadas congeladas, devem ser bem misturadas após a descongelação e antes do ensaio. *Evitar os ciclos repetidos de congelação e descongelação.*

Inactivação a quente das amostras não é recomendado.

7.1. DILUIÇÃO DA AMOSTRA

Antes do ensaio, todas as amostras devem ser diluídas 1+100 com o diluente para amostra IgG. Diluir 10µl da amostra com 1 ml do diluente para amostra IgG em tubos para obter uma diluição a 1+100 e misturar cuidadosamente com um Vortex.

8. PROCEDIMENTO DE ENSAIO

8.1. Preparação do ensaio

Por favor, leia atentamente o procedimento de teste **antes** de realizar o ensaio. A fiabilidade dos resultados depende do estrito seguimento das instruções contidas no procedimento de teste. O procedimento de teste seguinte só é válido para um procedimento manual. Se o ensaio for feito em sistemas automáticos ELISA aconselhamos a aumentar o número de etapas de lavagem de três para cinco e o volume da solução de lavagem de 300µl para 350µl. Antes de começar o ensaio, determinar, na folha fornecida com o kit, o plano de distribuição e identificação das amostras e dos standards. Seleccionar o número de tiras ou poços necessárias e colocá-las no suporte.

Por favor reserve pelo menos:

1 poço (por exemplo A1) para o branco do substrato
4 poços (por exemplo B1, C1, etc.) para o calibrador A, B, C e D.

Aconselha-se a determinar os calibradores e as amostras do paciente em duplicado.

Realize todos os passos do ensaio na ordem indicada e sem demora apreciável entre os passos.

Deve-se utilizar uma ponta de pipeta limpa para distribuir cada controlo e amostra.

Regular o incubador para $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1. Pipetar 100µl de cada calibrador (A, B, C, e D) e de amostras diluídas nos respectivos poços. Guardar o tubo A1 para o branco de substrato.
2. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incubar durante 1 hora \pm 5 min. a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. Depois da incubação, retirar a película, aspirar o conteúdo do poço e lavar cada poço três vezes com 300µl de solução de lavagem. Evitar o transbordar dos poços de reacção. O tempo entre cada ciclo de lavagem deve ser de >5seg. No fim, remover cuidadosamente o líquido restante batendo com os poços sobre papel absorvente antes do próximo passo!

Nota: A etapa de lavagem é muito importante! Uma lavagem insuficiente pode conduzir a uma fraca precisão e a valores de absorvância falsamente elevados.

5. Pipetar 100µl de conjugado anti-IgG de *Helicobacter pylori* em todos os poços excepto para o poço do branco (por exemplo A1). Fechar com a película.
6. **Incubar durante 30 min. à temperatura ambiente (20 a 25°C). Não expor à luz directa do sol.**
7. Repetir o passo número 4.
8. Pipetar 100µl da solução de substrato TMB para todos os poços.
9. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente (20 to 25°C) na obscuridade.**
10. Pipetar 100µl da solução de paragem para os tubos na mesma ordem e à mesma velocidade usada para a solução de substrato TMB.

A cor azul desenvolvida durante a incubação passa a amarelo.

Nota: Amostras de pacientes fortemente positivas podem causar precipitados escuros do cromogénio! Estes precipitados podem influenciar os valores medidos de densidade óptica. Recomenda-se a diluição da amostra com solução de cloreto de sódio fisiológico, por exemplo 1+1. Em seguida diluir a amostra a 1+100 com o tampão e multiplicar os resultados em NTU por 2.

11. Medir a absorvância da amostra a 450/620 nm nos 30 minutos seguintes à adição da solução de paragem.

8.2. Medição

Levar a zero do leitor ELISA com a ajuda do branco do substrato do poço A1.

Se – por razões técnicas – o leitor ELISA não puder ser ajustado a zero utilizando o branco do substrato A1, subtrair o valor da absorvância do tubo A1 a todos os outros valores de absorvância medidos a fim de obter resultados fidedignos!

Medir a absorvância de todos os poços a 450 nm e registar os valores de absorvância para cada controlo e amostra de paciente no plano de distribuição e identificação.

Uma leitura do segundo comprimento de onda empregando 620 nm como comprimento de onda de referência é aconselhada.

Calcular os valores médios de absorvância para todos os duplicados, se necessário.

9. RESULTADOS

9.1. Critérios de validação do teste

A fim de validar o ensaio, os critérios seguintes devem ser respeitados:

- **Branco do Substrato** em A1: Valor de absorvância **menor do que 0.100**
- **Calibrador A** em B1: Valor de absorvância **menor do que 0.200**
- **Calibrador B** em C1: Valor de absorvância **maior do que 0.200**
- **Calibrador C** em C1: Valor de absorvância **maior do que 0.500**
- **Calibrador D** em C1: Valor de absorvância **maior do que 1.100**

Calibrador A < Calibrador B < Calibrador C < Calibrador D

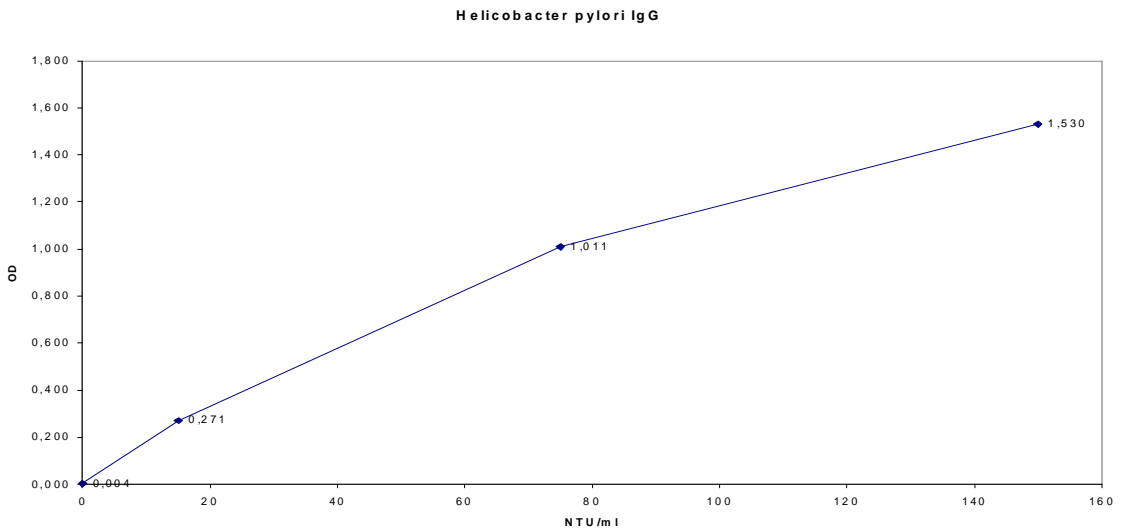
Se estes critérios não forem conseguidos, o teste não é válido e deve ser repetido.

9.2. Cálculo dos resultados

A fim de obter **resultados quantitativos em NTU/ml**, traçar uma curva de calibração inscrevendo os valores (médios) da absorvâncias dos 4 calibradores A, B, C e D, em ordenadas, em relação às correspondentes concentrações (0, 15, 75 e 150 NTU/ml), em abcissas, em papel milimétrico e coordenadas lineares.

Ler os resultados desta curva de calibração utilizando os valores (médios) da absorvância de cada amostra e de cada controlo. Todos os programas informáticos apropriados podem ser utilizados para a leitura e cálculo automático dos resultados.

9.3. Curva de calibração típica



9.4. Interpretação dos resultados

Intervalos de valores normais, para este teste de ELISA, devem ser estabelecidos por cada laboratório levando em conta a população de pacientes e as suas variações geográficas.

Os valores seguintes devem ser considerados como orientadores:

Reactivo	> 20 NTU/ml
Zona cinzenta (equivoca):	15 - 20 NTU/ml
Não reactiva:	< 15 NTU/ml

10. CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DO DESEMPENHO

10.1. Precisão

Inter-ensaio	n	Média(OD)	Cv (%)	média Cv (%)
Soro positivo	13	1,3	7.2	5.1
	13	3,7	3.0	

Intra-ensaio	n	Média(OD)	Cv (%)	média Cv (%)
Soro positivo	19	0.56	6.1	6.5
	19	1.50	7.0	

10.2. Especificidade do diagnóstico

A especificidade do diagnóstico é definida como a probabilidade de obter um resultado negativo na ausência de um analito específico. É de 92.0% (95% intervalo de confiança 0.84 – 0.99).

10.3. Sensibilidade do diagnóstico

A sensibilidade do diagnóstico é definida como a probabilidade de obter um resultado positivo em presença de um analito específico. É de 94.4% (95% intervalo de confiança 0.87 – 1).

10.4. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é definida como a concentração aparente do analito que pode ser distinguida do zero calibrador. É de 3 NTU/ml.

10.5. Interferências

Nenhuma interferência foi observada em soro hemolítico, lipémico ou icterico para concentrações que vão até 10 mg/ml de hemoglobina, 5 mg/ml de triglicerídeos e 0.2 mg/ml de bilirubinas.

Nota: Estes resultados baseiam-se em grupos de amostras estudadas; não se tratam de características técnicas garantidas.

11. LIMITES DO PROCEDIMENTO

Uma contaminação bacteriana ou ciclos repetidos de congelamento-descongelamento de amostras podem afectar os valores de absorvância. O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base no resultado de uma só análise. Um diagnóstico preciso deve levar em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como os dados serológicos.

Os dados serológicos têm de valor limitado no caso de pacientes imunodeprimidos e em recém-nascidos.

12. PRECAUÇÕES E AVISOS

- De acordo com o artigo 1 parágrafo 2b da directiva europeia 98/79/EC, a utilização de dispositivos médicos de diagnóstico in vitro é destinada pelo fabricante a garantir a aplicabilidade, o desempenho e a segurança do produto. Por conseguinte, o procedimento de teste, a informação, as precauções e os avisos, constantes nas instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidas. A utilização destes kits com analisadores ou equipamentos similares têm de ser validados. Qualquer modificação na concepção, composição e procedimento de teste, assim como a utilização com outros produtos não aprovados pelo fabricante, não são autorizados; só o utilizador é responsável por tais mudanças. O fabricante não é responsável pelos falsos resultados e por incidentes devidos a estes motivos. O fabricante não é responsável por resultados fornecidos por análise visual das amostras dos pacientes.
- Unicamente para diagnóstico in-vitro.
- Todos os componentes de origem humana utilizados para o fabrico destes reagentes foram analisados e foram considerados não reactivos em Ag HBs, anticorpos anti-VHI 1 e 2 e anticorpos anti-VHC. Todavia, todos os produtos devem ser considerados e tratados como sendo potencialmente infecciosos.
- Não trocar os reagentes ou as barras provenientes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes provenientes de outros fabricantes com os reagentes deste kit.
- Não utilizar reagentes após a expiração da data de validade.
- Utilizar pontas de pipetas, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos, para evitar a contaminação cruzada.
- Fechar cuidadosamente os frascos após utilização para evitar a evaporação e a contaminação microbiana.
- Antes de uma nova utilização, verificar os frascos de conjugado e de controlo, já utilizados, para excluir uma contaminação microbiana.
- Para evitar a contaminação cruzada e resultados falsamente elevados, introduzir as amostras de pacientes e o conjugado exactamente no fundo dos poços sem salpicar.
- O NovaLisa™ ELISA é unicamente destinado a ser utilizada por pessoal qualificado, devidamente familiarizado com as boas práticas laboratoriais.

AVISO:	Na concentração usada, Bronidox L, não tem praticamente nenhum risco toxicológico em caso de contacto com a pele ou as mucosas!
AVISO:	O ácido sulfúrico é irritante para os olhos e a pele. Guardar fora do alcance das crianças. Em caso de contacto com os olhos, lavar cuidadosamente com água e consultar um médico!

12.1. Medidas de eliminação

Os resíduos dos reagentes e preparações são considerados como resíduos potencialmente perigosos. A eliminação destes resíduos está sujeita a regulamentos nacionais e locais. Contactar as autoridades locais ou as empresas de gestão de resíduos para obter conselhos sobre a eliminação de resíduos perigosos.

13. INFORMAÇÃO PARA ENCOMENDAS

Prod. No.: HELG0220 Helicobacter pylori IgG-ELISA (96 Determinações)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

















Marshall, B.J., Royce, H., D.I., Goodwin, C.S., Taylor, N.S., Edmonds, P., Sly, L.I., Brenner, D.J. (1982) Original Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letter* 25:83

Warren J.R. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet*: 1273-1275

Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vanderstetten, D.P., Chang, y., Vogelmann, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K. (1991) H. Pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325: 1127-1131

Stolte, M. Eidt, S. (1993) Healing gastric MALT lymphomas by eradicating H.Pylori *Lancet* 342:568

Stolte, M. (1992) H.Pylori and gastric MALT lymphoma *Lancet* 339:745-746

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles/ Legenda/ Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro/ Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote/ Número do Lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento/ Temperatura de Armazenamento
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE/ Marca CE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo/ Referência de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso/ Consultar as Instruções de Utilização
	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca/ Microplaca
	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado/ Conjugado
	Calibrator/ Kalibrator/ Etalon/ Calibratore/ Calibrador/ Calibrador
	Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgG/ soluzione tampone per i campioni IgG/ solución tampón para muestras IgG/ Solução de tampão IgG para amostras
	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante/ Solución de parada/ Solução de bloqueio
	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB/ Solução substrato TMB
	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Tampon de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20/ Solução de lavagem concentrado 20x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests/ Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Helicobacter pylori IgG-ELISA

Assay Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and standards on the form supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank (z.B. A1)	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Sample (diluted 1+100)
Standard A	-	100µl	-	-	-	-
Standard B	-	-	100µl	-	-	-
Standard C	-	-	-	100µl	-	-
Standard D	-	-	-	-	100µl	-
Sample (1+100 diluted)	-	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution						
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution						
TMB Substrate Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for 15 min at room temperature in the dark						
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)						

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

HELG0220engl,dt,fr,it,es,port07082009-CR