ENZYWELL

HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/ Hersteller/
Κατασκευάζεται από/ Fabricado por/ Fabriqué par:
DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA) - Italy

CE

INDICE / INDEX / INHALT/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE /CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / VERWENDUNGSZWECK/ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / PHYSIOLOGIE/ ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃA DO TESTE

3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / TESTPRINZIP/ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ KIT ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃA DO REAGENTE /

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN /ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN/ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ART UND LAGERUNG DER PROBEN / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / TESTDURCHFÜHRUNG / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /

9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / TESTSCHEMA /ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /

10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / TESTVALIDIERUNG / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃA DO TESTE /

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / GRENZEN DES VERFAHRENS / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /

13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ANALYTISCHE SPEZIFITÄT /ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT /ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

15. PRECISIONE / PRECISION / PRÄZISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / "TROUBLE SHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN) /ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / LITERATUR / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS

ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 **(Italiano)**

1. UTILIZZAZIONE

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

2. INTRODUZIONE

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

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

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

3. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

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

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

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

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.
- **Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 pozzetti sensibilizzati con Helicobacter pylori.

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

CAL CALIBRATORI 5 x 1.6 mL

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

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

Cal 1	5 UA/ml (Calibratore Negativo),
Cal 2 (Cut-off Pediatrico)	10 UA/m
Cal 3 (Cut-off Adulti)	15 UA/ml
Cal 4	50 UA/ml
Cal 5	100 UA/ml

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL
Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane coniugati con perossidasi, in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .
Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Da utilizzare per la diluizione dei campioni.
Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H_2O_2 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Soluzione di H_2SO_4 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).
BUSTA DI POLIETILENE (1).

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

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.
La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

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

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

6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

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

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

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

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

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**

   Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
    - installazione e requisiti particolari
    - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
    - specifiche del produttore e performance dello strumento
    - manutenzione e assistenza tecnica

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a –20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori

auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.
Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.
Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

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

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente. Lasciare un pozzetto libero per il bianco (si userà solo per il substrato).
Distribuire 100 µL dei calibratori NON DILUITI nei pozzetti previsti, possibilmente in duplicato, e 100 µl di campione diluito nei rimanenti pozzetti.
Coprire i pozzetti con la pellicola protettiva ed incubare per 45 min. a 37°C. Lavare 4 volte lasciando la soluzione di lavaggio (300 µL) nei pozzetti per 30 secondi per ogni ciclo. Aggiungere 100 µL del coniugato in ciascun pozzetto ed incubare di nuovo per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Lavare di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi distribuire il Substrato (100 µL/pozzetto). Dopo 15 min. a temperatura ambiente bloccare la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Leggere le densità ottiche (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

9. Schema del saggio

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

10. VALIDAZIONE DEL TEST

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

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi
Il Cut-off dei sieri di adulti corrisponde al Calibrator 3.
Il Cut-off dei sieri pediatrici corrisponde al Calibrator 2.

Calcolare il rapporto fra il valore medio delle O.D. del campione in esame e quello del Cut-Off (INDEX). Il campione sarà giudicato:
Positivo: quando il rapporto è > 1.2.
Dubbio: = ± 20% del Cut-Off.
Negativo: quando il rapporto è < 0.8.
In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

Risultati semiquantitativi

Riportare in grafico le D.O. dei calibratori, sottratte dalla D.O. del bianco, in funzione del titolo di ciascun calibratore.
Ottenere il titolo corrispondente del campione in esame per interpolazione.
NOTA: Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.
Se la D.O. di un campione o calibratore è superiore a 2,0, leggere a 405 nm e moltiplicare il valore per 3.

Il grado di immunità può essere interpretato come segue:
IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-H. pylori nel campione è > 10 UA/mL (per pazienti pediatrici)
> 15 UA/ml (per pazienti adulti)
NON IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-H. pylori è < 5 UA/mL.
DUBBIO: quando il valore è compreso fra i due valori. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta precoce dell'infezione potrebbero risultare negativi con questa tecnica.
Sieri fortemente lipemici, emolizzati od inattivati col calore possono dare luogo a risultati falsi e non dovrebbero essere quindi utilizzati.
Come per tutti i tests sierologici, il risultato deve essere comunque valutato insieme ad altri dati clinici e diagnostici.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

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

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

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

Risultati

		RIFERIMENTO	
		+	**-**
DIESSE	**+**	**132**	**6**
	-	**1**	**60**

Il kit Helicobacter pylori presentava 6 falsi negativi ed 1 falso positivo.
La sensibilità e la specificità sono risultate del 99,2% e del 90,9% rispettivamente.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

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

Precisione tra sedute

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

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

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

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 **(English)**

1. INTENDED USE

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

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

In 1983, Warren and Marshall identified Helicobacter pylori, a new gram-negative bacterial pathogen, in patients suffering from gastritis, and this finding led to studies on the relationship between bacterial infection and chronic gastric disease . The pathogen has been shown to be associated with peptic ulcer, chronic gastritis type B and duodenitis. It has been demonstrated that in patients with gastritis, eradication of the bacteria led to healing of the anatomical lesion .
Diagnostic procedures for the detection of the organism generally involve invasive (gastroscopic) techniques for sample collection.
However, a specific immune response is seen in infected patients. The serological test thus represents a useful alternative to the invasive bioptic technique. IgG levels rise with infection and remain constantly high until the infection is eliminated. The efficacy of antimicrobial therapy can therefore be monitored via changes in specific IgG antibody.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) .
The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.
After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase.
The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added.
The density of the colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. Whenthe enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulfuric acid solution, the resulting yellow colour can be easily read on an ELISA microplate reader.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.
- **Bring reagents to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells coated with Helicobacter pylori antigens.
Use: open the package at the opposite end from the code (P, followed by the lot number) which serves for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CAL CALIBRATORS 5 x 1.6 mL
Contents: Diluted human serum at known concentrations of antibodies to Helicobacter pylori, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use without further dilution.
The 5 calibrators have the following titers expressed in Arbitrary Units/ml:

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

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

CONJ CONJUGATE 1x16 mL
Contents: monoclonal antibodies anti-human IgG labelled with Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

WASH BUF WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .
Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 (PF93611) 1 x 100 mL ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
To be used to diluite samples.
Contents:Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL Ready for use. ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
H_2SO_4 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).
POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.
- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 225-375 µl
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.
The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

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

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

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

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

Health and Safety Information

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

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

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature**.**
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents sbould be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for excusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO_2 incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
    - installation and particular requisites
    - operating principles, instructions, precautions and risks
    - manufacturer's specifications and instrument performance
- servicing and maintenance

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

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

8. TEST PROCEDURE

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

Dilute the samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Leave one well empty for the blank (only the substrate will be used). Pipet 100 µl of UNDILUTED calibrators in the wells of a strip, preferably in duplicate, and 100 µl of diluted sample in the remaining wells.
Cover the wells with protective film and incubate for 45 minutes at 37°C. After washing four times (300 µL), soaking the wells in the washing solution for 30 seconds for each cycle, add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. Wash the plate again 4 times, as described above. Finally, add the Substrate (100 µL/well).
After 15 minutes at room temperature, stop the enzymatic reaction with 100 µL of Stop Solution.
Read the optical densities (O.D.) at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min. Take a new reading at 405 nm if the O.D. are higher than 2000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

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

10. TEST VALIDATION

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

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

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

Calculate the ratio between the average O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX). The sample is considered:
Positive: if the ratio is > 1.2.
Doubtful: ± 20% of the Cut-Off.
Negative: if the ratio is < 0.8.
If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

Semiquantitative results
Report the OD of the calibrators on a graph after subtracting the OD of the blank. The corresponding titer of the test sample can be obtained by interpolation.
NOTE: A standard curve must be performed for each run.
If the O.D. of any sample or calibrator is over 2.0, take the reading at 405 nm and multiply the value by 3.

The degree of immunity can be interpreted as follows:
IMMUNE: when the anti-H. Pylori IgG concentration in the sample is > 10 AU(ml (for pediatric patients)
>15 AU/ml (for adult patients)
NON IMMUNE: when the anti-H. pylori IgG concentration is < 5 AU/mL
DOUBTFUL : if the result is between the two values. In this case it is advisable to repeat the test in duplicate.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the early acute phase of infection may be negative by this procedure.
Highly lipemic, icteric, hemolysed or heat-inactivated sera may cause false results and should not be used.
As with all serological tests, the results should be interpreted in conjunction with other clinical and diagnostic data.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

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

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

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

Results

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	**+**	**132**	**6**
	-	**1**	**60**

The Helicobacter pylori kit result 6 false negative and 1 false positive.
The sensitivity and specificity were respectively 99.2% and 90.9%.

15. PRECISION

Within run Precision on three different lots

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

Between run Precision

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

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

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

17. REFERENCES

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

GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 **(Deutsch)**

1. VERWENDUNGSZWECK
ELISA-Assay zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen Helicobacter pylori in humanem Serum.

2. PHYSIOLOGIE
1983 entdeckten Warren und Marshall bei an Gastritis erkrankten Patienten die gramnegativen Bakterien Helicobacter pylori. Diese Erkenntnis führte zu Studien über die Beziehung zwischen einer bakteriellen Infektion und einer chronischen Magenerkrankung. Der Erreger wird mit peptischen Ulzera, chronischer Typ-B-Gastritis und mit Duodenitis in Verbindung gebracht. Die Eliminierung des Bakteriums führt bei Patienten mit Gastritis zur einer Heilung der anatomischen Läsion.
Zum Nachweis des Bakteriums werden i.d.R. invasive (gastroskopische) Verfahren zur Probengewinnung eingesetzt.
Bei infizierten Patienten kann jedoch eine spezifische Immunantwort beobachtet werden. Der serologische Test stellt daher eine sinnvolle Alternative zum invasiven bioptischen Verfahren dar. Die IgG-Werte steigen bei einer Infektion an und bleiben so lange hoch, bis die Infektion eliminiert wurde. Die Wirksamkeit einer antimikrobiellen Therapie kann aus diesem Grund anhand der Änderungen der spezifischen IgG-Antikörper überwacht werden.

3. TESTPRINZIP
Der Test basiert auf der ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).
Das Antigen ist an eine Festphase gebunden. Die spezifischen Immunglobuline werden bei der Inkubation mit verdünntem Patientenserum an das Antigen gebunden.
Die ungebundenen Proteine, die nicht reagiert haben, werden aus den Wells gewaschen; danach folgt eine Inkubation mit dem Konjugat aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes IgG, die mit Peroxidase gekoppelt sind.
Das ungebundene Konjugat wird entfernt und das Peroxidase-Substrat zugegeben.
Die Intensität der Farbe, die sich entwickelt, ist proportional zur Konzentration von spezifischen Antikörpern, die in der Probe vorhanden sind. Wenn die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäurelösung gestoppt wird, kann die entstandene gelbe Farbe einfach mit einem ELISA-Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden.

4. KITKOMPONENTEN
Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen.
Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

MT PLATE MIKROTITERPLATTE 12 x 8 Wells, beschichtet mit Helicobacter pylori-Antigenen.
Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (P plus Lotnummer) öffnen und die nicht benötigten Streifen im beigefügten Plastikbeutel mit dem Silica-Gel lagern; die Luft herausdrücken und gut verschließen.

CONJ KONJUGAT 1x16 mL
Inhalt: Monoklonale Antikörper gegen humanes IgG, gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0,05 % Phenol und 0,02 % Bronidox. Gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

CAL KALIBRATOREN 5 x 1.6 mL
Inhalt: Verdünntes Humanserum mit bekannten Konzentrationen von Antikörpern gegen Helicobacter pylori in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.
Die 5 Kalibratoren haben die folgenden Titer (in Arbitrary Units/ml):

Kalibrator	Konzentration
Cal 1 (Negativkontrolle)	5 AU/ml
Cal 2 (Cut-Off bei Kindern)	10 AU/ml
Cal 3 (Cut-Off bei Erwachsenen)	15 AU/ml

Cal 4	50 AU/ml
Cal 5	100 AU/ml

Farbe: Die Farbintensität der Kalibratoren ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Gebrauchsfertig. ***LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR***
Inhalt: 0,26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0,01% Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0,05 mol/l Zitratpuffer (pH 3,8).

SAMP DIL 2 VERDÜNNUNGSMITTEL 2 (PF93611) 1x100 mL Für die Verdünnung von Proben. ***LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR***
Inhalt: Proteinlösung in Phosphatpuffer mit 0,09 % Natriumazid und Methylorange.

WASH BUF 10x WASCHPUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR***
Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0,5 % Brij.
Rekonstitution: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten sie vor der Verdünnung bei 37 °C gelöst werden.

H_2SO_4 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602) 1x16 mL ***LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR***
Inhalt: H_2SO_4 0,3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.
Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

ABDECKFILM (2).
POLYEHTYLENBEUTEL (1).

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN
- Inkubator bei 37 °C
- Mikrotiterplatten-Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis mindestens 2,000
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispensiervolumen zwischen 225-375 µl
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten für die exakte Pipettierung von 10, 100, 1000 µl
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorit-Lösung (5 %)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

5. LAGERUNG UND STABILITÄT NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

Die Reagenzien müssen bei 2-8 °C gelagert werden.
Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

Die Reagenzien haben nach dem ersten Öffnen und/oder der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität.

REAGENZ	KONDITIONEN	
MIKROTITERPLATTE	6 Wochen bei 2-8 °C im Polyethylenbeutel	
KALIBRATOREN	6 Wochen bei 2-8 °C	
KONJUGAT	6 Wochen bei 2-8 °C	
SUBSTRAT	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C, 1 Woche	bei 15-30 °C im Dunkeln
VERDÜNNUNGSMITTEL	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C	
WASCHPUFFER	2 Wochen bei 2-8 °C, 5 Tage bei 15-30 °C	
STOPPLÖSUNG	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C	

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSHINWEISE
NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Achtung: Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, die mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ waren. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Erreger enthalten, sollten alle Materialien humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

Entsorgung der Abfälle: Die Serum-Proben und die verwendeten Reagenzmittel müssen als infizierte Abfälle behandelt werden, das heißt, im Einklang mit den geltenden Vorschriften entsorgt werden.

- Gesundheits- und Sicherheitsinformationen
  Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie Einweg-Handschuhe und einen Augenschutz während des Umgangs mit Proben und der Testdurchführung. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.
- Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen von schädlichen oder reizenden Substanzen:
  e) Der Waschpuffer enthält Detergenzien.
  f) Das Konjugat und die Kontrollen enthalten Phenol.
  g) Das Substrat ist eine Säure.
  h) Die Kontrollen enthalten 0,09 % Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden.

  Falls irgendeines der Reagenzien in Kontakt mit den Augen oder der Haut kommt, waschen Sie den Bereich intensiv mit Wasser.
- Mehrfach verwendbare Materialien oder Gegenstände sollten nach Gebrauch sterilisiert werden. Die bevorzugte Methode ist das Autoklavieren für eine Stunde bei 121 °C, Einwegmaterialien sollten autoklaviert oder verbrannt werden.
- Schwefelsäure (Stop Solution) und Salzsäure (wird für das Waschen der Laborgläser benötigt) sind ätzend und sollten mit entsprechender Sorgfalt behandelt werden. Bei Kontakt mit Augen oder Haut gründlich mit Wasser abwaschen.
- Neutralisierte Säuren oder anderer Flüssigabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorit mit einer Endkonzentration von mindestens 1,0 % dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorit (1 %) ist erforderlich, um eine effektive Dekontamination sicherzustellen.
- Verschüttete potentiell infektiöse Materialien sollten sofort mit saugfähigem Papier aufgewischt werden, und der kontaminierte Bereich sollte mit Natriumhypochlorit (1 %) nachgewischt werden, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Natriumhypochlorit sollte nicht bei verschütteter Flüssigkeit, die Säure enthält, verwendet werden, bevor die Flüssigkeit trocken aufgewischt wurde. Materialien, die für das Aufwischen verschütteter Flüssigkeiten verwendet wurden, inklusive der Handschuhe, sollten wie potentiell biogefährdender Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- **Lagerung bei 2-8 °C**
- Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30 °C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass der Thermostat nicht unterhalb 35 °C und nicht über 39 °C anzeigt.**
- Öffnen Sie die Packung mit den Streifen erst nach 30 Minuten bei Raumtemperatur.
- Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Haltbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
- Die Testdurchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
- Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
- Vermeiden Sie Gefrierschränke mit Abtauautomatik für die Lagerung von Proben.
- Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorit-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
- Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
- Vermeiden Sie Verschleppungen beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.
- Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells.
- Enzymimmunoassays können gelegentlich einen “Edge-Effect” zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37 °C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO_2 Inkubatoren.
- Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.

- Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.
- Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigen werden
- Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
    - Installation und besondere Bedarfsartikel
    - Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
    - Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
    - Service und Wartung

7. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

- Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis“ entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Den Gebrauch von Tiefkühlschränken mit automatischem Abtausystem für die Aufbewahrung der Proben vermeiden. Aufgetaute Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Eine Hitzeinaktivierung kann zu falschen Ergebnissen führen. Die Qualität einer Probe kann durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden. Sie führt zu falschen Ergebnissen.
- Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden.
- **Es dürfen keine Plasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!**

8. TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bereiten Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen vor.
- Bereiten Sie den Waschpuffer vor: Verdünnen Sie den Washing Buffer 1:10 mit destilliertem Wasser (Beispiel 100 ml + 900 ml H_2O).

PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Lassen Sie die erste Well für den Substratleerwert frei (100 µl Substrat und 100 µl Stopplösung pipettieren). Pipettieren Sie 100 µl unverdünnten Kalibrator in die Wells eines Streifens (vorzugsweise in Doppelbestimmung) und 100 µl der verdünnten Probe in die übrigen Wells.
Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 4-mal waschen (300 µl, mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Konjugat zugeben. Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. Erneut 4-mal wie oben beschrieben waschen. 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).
15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).
Die optischen Dichten (OD) bei 450 nm oder 450/620 nm innerhalb von 30 Minuten messen. Wiederholen Sie die Messung bei 405 nm, falls einige ODs über 2000 liegen.

9. TESTSCHEMA

Die erste Well (A1) für den Substratleerwert frei lassen.

A. 100 µl unverdünnten Kalibrator und verdünnte (1:101) Proben in die entsprechenden Wells pipettieren.
B. 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
C. 4-mal waschen (300 µl).
D. Zu allen Wells außer Well A1 100 µl Konjugat zufügen.
E. 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
F. 4-mal waschen (300 µl).
G. 100 µl Substrat in alle Wells (einschließlich Well A1) pipettieren.
H. 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
I. 100 µl Stopplösung in alle Wells (einschließlich Well A1) pipettieren.
J. Messen Sie die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten. Bei Readern mit 2 Wellenlängen stellen Sie den Referenzfilter auf 600-650 nm ein.

10. VALIDITÄT DES TESTS

Subtrahieren Sie den Substratleerwert von allen Extinktionen. Die OD des Calibrator 3 muss ≥ 0,2 sein. Die OD des Calibrator 5 muss mindestens das 1,5fache der OD des Calibrator 3 sein. Die OD des Substratleerwerts muss <= 0,150 sein.

11. BEREICHNUNG DER ERGEBNISSE

SEMIQUANTITATIVE ERGEBNISSE

a. Subtrahieren Sie die Blank ODs von allen übrigen Messungen.
b. Erstellen Sie eine Standardkurve, indem Sie die ODs der Kalibratoren gegen die entsprechenden Konzentrationen (AU/ml) auf Millimeterpapier auftragen.
c. Interpolieren Sie die ODs der Proben auf der Standardkurve, um die entsprechenden Konzentrationen für die Proben zu erhalten.

HINWEIS: Für jeden Testansatz muss eine Standardkurve erstellt werden.

Wenn die OD einer Probe oder eines Kalibrators über 2,0 ist, nehmen Sie die Messung bei 405 nm und multiplizieren den Wert mit 3.

Der Grad der Immunität kann folgendermaßen interpretiert werden:

IMMUN: wenn die Anti-Helicobacter pylori IgG-Konzentration
> 10 AU/ml (bei Kindern)
> 15 AU/ml (bei Erwachsenen)
NICHT IMMUN: wenn die Anti-Helicobacter pylori IgG-Konzentration < 5 AU/ml
ZWEIFELHAFT: Falls das Ergebnis zwischen den beiden Werten liegt. In diesem Fall empfiehlt es sich, den Test in Doppelbestimmung zu wiederholen.

QUALITATIVE ERGEBNISSE
Subtrahieren Sie die Blank ODs von allen übrigen Messungen.

Der Cut-Off bei Seren von Erwachsenen entspricht Calibrator 3, der Cut-Off bei Seren von Kindern entspricht Calibrator 2.

Berechnen Sie die Ratio zwischen dem Extinktionsmittelwert der Probe und dem des Cut-Off. Die Ratio ist der Cut-Off-Index (COI). Die Probe ist:

positiv: wenn die Ratio > 1,2 ist,
zweifelhaft: wenn die Ratio zwischen 0,8 und 1,2 (Cut-Off ± 20 %) ist,
negativ: wenn die Ratio < 0,8 ist.
Falls das Ergebnis zweifelhaft ist, wiederholen Sie den Test. Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Probe, falls das Ergebnis zweifelhaft bleibt.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Eine Serumprobe, die in der frühen akuten Phase einer Infektion entnommen wurde, kann in diesem Test negativ ausfallen.
Stark lipämische, ikterische, hämolysierte oder hitzeinaktivierte Seren können zu falschen Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
Wie bei allen serologischen Tests sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Die analytische Spezifität des Diesse Helicobacter pylori IgG Kit wurde in einem Inhibitionstest bestimmt. Zu den Patientenseren wurden Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni und E. coli hinzugefügt. Zwischen den Referenzproben und den Proben mit den Antigenen wurden keine Unterschiede festgestellt. Daraus kann geschlossen werden, dass der Test spezifisch für Anti-Helicobacter pylori IgG ist.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer in einem Krankenhauslabor durchgeführten klinischen Studie wurden 199 Humanseren untersucht. 58 dieser Proben stammten aus der Abteilung für Gastroenterologie. Insgesamt waren 138 Proben positiv.
Die Proben wurde im Western-Blot untersucht. Der Western-Blot gilt als Referenzmethode.

Ergebnisse

		REFERENZ	
		+	**-**
Diesse	**+**	**132**	**6**
	-	**1**	**60**

Mit dem Diesse Helicobacter Pylori IgG Kit ergaben sich 6 falsch negative und 1 falsch positive Probe.

Die Diesse-Methode bietet 99,2 % Sensitivität und 90,9 % Spezifität.

15. PRÄZISION

Präzision in der Serie mit drei verschiedenen Lots

Cut-Off n=16	***Lot 78***	***Lot 79***	***Lot 80***
O.D.	0,419	0,608	0,6
CV%	12	15	10

Interassay-Präzision

	AU/ml				
Probe	**I. Serie**	**II. Serie**	**III. Serie**	**Mittelwert**	**CV%**
PYG1	6,2	7	6,1	6,4	8
PYG2	24,8	26,1	23,9	24,9	4
PYG3	81,3	88,4	84,8	84,8	4

16. "TROUBLESHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN)

Wenn Sie sowohl die Angaben in der Gebrauchsanweisung für die Testdurchführung und deren Spezifikationen beachten als auch sorgfältig mit den Reagenzien umgehen und pipettieren, können Sie die folgenden Fehler vermeiden.

PROBLEM	**MÖGLICHE URSACHE**	**MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG**
Ungültiger Testrun (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. Wiederholen Sie den Test.
	Nichtreaktive Platte	Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)
		Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.) Wiederholen Sie den Test.
Ungültiger Testrun (alle positiv)	Kontamination des Substrates	Nehmen Sie ein neues Substrat.
	Unvorschriftsmäßiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
Schlechte Präzision	Unvollständiges Waschen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschritt. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.
	Optischer Weg nicht sauber	Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.
Nicht ausreichende Farbentwicklung	Unvorschriftsmäßige Inkubationszeit oder -temperatur	Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.
		Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.
	Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.

17. LITERATUR

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

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZYWELL
IgG ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ

REF 91060 **(Ελληνικά)**

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgG ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1983, οι Warren και Marshall εντόπισαν σε ασθενείς που έπασχαν από γαστρίτιδα, ένα νέο παθογόνο βακτήριο αρνητικό κατά Gram, που ονόμασαν Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Στη συνέχεια έγιναν αρκετές μελέτες με σκοπό να διευκρινιστεί η σχέση μεταξύ της βακτηριακής λοίμωξης και των χρόνιων παθολογιών του γαστρεντερικού συστήματος. Αποδείχθηκε ό,τι το παθογόνο συνδυάζεται με το πεπτικό έλκος, με την χρόνια γαστρίτιδα του τύπου Β και με το έλκος του δωδεκαδάκτυλου. Αποδείχθηκε ό,τι στους ασθενείς που έπασχαν από γαστρίτιδα, η εξάλειψη του βακτηρίου είχε ως αποτέλεσμα την ίαση του ανατομικού έλκους.
Οι διαγνωστικές διαδικασίες των μεθόδων που στοχεύουν στην ανίχνευση αυτού του βακτηρίου, προβλέπουν επεμβατικές τεχνικές (γαστροσκοπήσεις) για την συλλογή δείγματος για βιοψία.
Παρ' όλα αυτά παρατηρείται στον ασθενή, μια ειδική ανοσολογική απόκριση. Το ορολογικό τεστ αντιπροσωπεύει λοιπόν μία έγκυρη εναλλακτική μέθοδο ως προς την επεμβατική τεχνική συλλογής υλικού για βιοψία. Το επίπεδο των IgG αυξάνεται κατά την διάρκεια της νόσου και παραμένει σταθερό στον χρόνο, εκτός και αν η λοίμωξης εξαλειφθεί. Μέσω λοιπόν της διακύμανσης της συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων μπορεί να εξακριβωθεί η αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής θεραπείας.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) .
Το αντιγόνο συνδέεται με τη στερεά φάση. Οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό.
Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από μονοκλωνικά αντισώματα ανθρώπινων αντι IgG σεσημασμένα με υπεροξειδάση.
Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης.
Η ένταση του χρώματος που σχηματίζεται είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον υπό εξέταση ορό. Όταν η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη διαλύματος θειικού οξέος, το κίτρινο χρώμα που προκύπτει μπορεί εύκολα να διαβαστεί σε έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων ELISA.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ KIT ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ.
- **Να φέρνετε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.**

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12 x 8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού.
Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (P, ακολουθούμενο από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε τη βάση και τοποθετήστε τις απαραίτητες ταινίες. Βάλτε και πάλι πίσω στη σακούλα από πολυαιθυλένιο, που περιέχει γέλη πυριτίας τις ταινίες που δεν χρησιμοποιήσατε, αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε την πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος.

CAL ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ 5 x 1.6 mL
Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων κατά του H. Pylori σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% e sodio azide 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.
Οι 5 βαθμονομητές έχουν τους παρακάτω τίτλους εκφρασμένους σε Αυθαίρετες μονάδες(AU)/ml:

Cal 1	5 AU /ml (Αρνητικός Βαθμονομητής),
Cal 2 (Cut-off Παιδιατρικό)	10 AU /m
Cal 3 (Cut-off Ενηλίκων)	15 AU /ml
Cal 4	50 AU /ml
Cal 5	100 AU /ml

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 1 x 16 mL
Περιεχόμενο: διάλυμα από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgG συζευγμένα με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.

WASH BUF 10x ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5%.
Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν την αραίωση.

SAMP DIL 2 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 2 (PF93611) 1 x 100 mL ***ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Χρησιμοποιείται για την αραίωση των δειγμάτων.
Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες,, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x12 mL. Έτοιμο για χρήση. ***ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H_2O_2 0,01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL ***ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Διάλυμα H_2SO_4 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).
ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.
- Επωαστήριο σε 37°C
- Αναγνώστης μικροπλακιδίων (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm και 405 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π. >= 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μL
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.
- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 10, 100, 1000 μL διαλύματος

5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2/8°C.
Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη πάνω σε κάθε στοιχείο καθώς και πάνω στην ετικέτα της συσκευασίας.

Τα Αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	**ΣΥΝΘΗΚΕΣ**
ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ	6 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ	6 εβδομάδες στους 2/8°C
ΣΥΖΥΓΕΣ	6 εβδομάδες στους 2/8°C
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C στο σκοτάδι
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C
ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ	έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C, 5 ημέρες σε 15/30 °C
ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΤΕ ΣΤΟΥΣ 2-8°C

Προσοχή:
Αυτή η συσκευασία περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από ελέγχους και έχουν βρεθεί αρνητικά, σε εγκεκριμένα από την FDA τεστ, τόσο όσον αφορά την ανίχνευση του HbsAg όσο και για τα αντισώματα αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη

εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Χρησιμοποιείτε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις που προβλέπονται από τους κανονισμούς ασφαλείας του εργαστηρίου.

Διαχείριση των κατάλοιπων: τα δείγματα του ορού και ο* αντιδραστηρι*α που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

7. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε τα δείγματα. Πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μετά από κάθε ανάλυση.
8. Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
   α) το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
   β) το συζυγές περιέχει φαινόλη
   γ) το υπόστρωμα είναι όξινο
   δ) Οι βαθμονομητές περιέχουν Αζίδιο Νατρίου (0,09%) το οποίο μαζί με τον χαλκό και τον μόλυβδο μπορεί να σχηματίσει ισχυρά εκρηκτικά αζιδικά ιζήματα μετάλλων.
   Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνατε με άφθονο νερό.
9. Οι συσκευές που δεν είναι μίας χρήσης, πρέπει να αποστειρώνονται, κατά προτίμηση στον κλίβανο, για 1 h σε 121°C, ενώ το υλικό μίας χρήσης πρέπει να μπαίνει στον κλίβανο ή να αποτεφρώνεται.
10. Το θειικό οξύ, που περιέχεται στο Stop Solution και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα του υάλινου εξοπλισμού, είναι διαβρωτικά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση που έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνατε με άφθονο νερό.
11. Εξουδετερωμένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Μια έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά, υπό κανονικές συνθήκες, είναι αρκετή για να γίνει μία αποτελεσματική απολύμανση.
12. Τυχόν χυμένα υγρά, δυνητικά μολυσματικά, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η επιφάνεια να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την διαδικασία ανάλυσης. Αν τα υγρά περιείχαν ένα οξύ, τότε στεγνώστε πολύ καλά την επιφάνεια πριν χρησιμοποιήσετε το υποχλωριώδες νάτριο. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν για να καθαριστούν τυχόν χυμένα υγρά, πρέπει να απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ό,τι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χείλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO_2.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ό,τι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ό,τι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.

24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
    - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφές
    - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
    - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
    - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Το δείγμα αποτελείται από ορό που προέρχεται από αίμα που έχει συλλεχθεί με φλεβική λήψη και έχει περάσει από όλες τις διαδικασίες που προβλέπονται από τους βασικούς κανονισμούς των εργαστηρίων. Ο νωπός ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C, ενώ για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξτε στους –20°C. Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη και πριν να το ρίξετε στην κυψελίδα, ανακινήστε το καλά.. Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του δείγματος, και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.
Δείγματα με ισχυρή αιμόλυση, με ίκτερο, λιπαιμικά ή μολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.
Το τεστ δεν μπορεί να γίνει πάνω σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες.
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H2O).

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 µL ορού σε 1 mL διαλύτη. Αφήστε ελεύθερη μία κυψελίδα για το τυφλό δείγμα (θα χρησιμοποιηθεί μόνο για το υπόστρωμα).
Ρίξτε 100 µL βαθμονομητών ΟΧΙ ΑΡΑΙΩΜΕΝΩΝ, στις προβλεπόμενες κυψελίδες, κατά προτίμηση εις διπλούν, και 100 µl αραιωμένου δείγματος στις υπόλοιπες κυψελίδες.
Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Κάνετε 4 εκπλύσεις αφήνοντας το washing buffer (300 µL) στις κυψελίδες για 30'' σε κάθε έκπλυση. Προσθέστε 100 µL συζυγούς σε κάθε κυψελίδα και επωάστε και πάλι για 45 λεπτά σε 37°C καλύπτοντας και πάλι τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία.. Ξεπλύνατε και πάλι το πλακίδιο 4 φορές, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 µL/ανά κυψελίδα.. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 µL Stop Solution. Διαβάστε τις Απορροφήσεις (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.. Διαβάστε τις και πάλι στα 405 nm αν υπάρχουν Ο.Π. μεγαλύτερες από 2.000.

9 Διάγραμμα της διαδικασίας ανάλυσης για τα IgG του HELICOBACTER PYLORI

STEP 1	Ρίξτε 100 µL αραιωμένου ορού/ορών ελέγχων στις κυψελίδες της ταινίας
	Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
	Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
STEP 2	Ρίξτε 100 µL συζυγούς ανά κυψελίδα
	Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
	Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
STEP 3	Ρίξτε 100 µL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα
	Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
STEP 4	Προσθέστε 100 µL Stop Solution
	Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά.

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (<= 0.150) από όλες τις άλλες τιμές. Η Ο.Π. του Βαθμονομητή 3 πρέπει να είναι ≥ 0.2 της Ο.Π. Ο Βαθμονομητής 5 πρέπει να έχει μία Ο.Π. ίση με 1,5 φορά εκείνη του Βαθμονομητή 3.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Ποιοτικά αποτελέσματα

Το Cut-off των ορών των ενηλίκων αντιστοιχεί με τον Βαθμονομητή 3.
Το Cut-off των παιδιατρικών ορών αντιστοιχεί με τον Βαθμονομητή 2.

Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της μέσης τιμής των Ο.Π. του υπό εξέταση δείγματος και εκείνης του Cut-off (INDEX).
Το δείγμα θα κριθεί:
Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2.
Αμφίβολο: = ± 20% του Cut-off.
Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8.
Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβατε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμείνει αμφίβολο επαναλάβατε την αιμοληψία.

Ημιποσοτικά αποτελέσματα

Μεταφέρατε σε γράφημα τις Ο.Π. των βαθμονομητών, που έχουν αφαιρεθεί από την Ο.Π. του τυφλού, ανάλογα με τον τίτλο του κάθε βαθμονομητή.
Εξάγετε τον τίτλο που αντιστοιχεί στο υπό εξέταση δείγμα, με παρεμβολή.
ΣΗΜ.: Πρέπει να κάνετε μία στάνταρντ καμπύλη για κάθε κύκλο ανάλυσης.
Αν η Ο.Π. ενός δείγματος ή βαθμονομητή, είναι μεγαλύτερη από 2,0, διαβάστε την στα 405 nm και πολλαπλασιάστε την τιμή επί 3.

Ο βαθμός ανοσίας μπορεί να ερμηνευτεί όπως ακολουθεί:
ΘΕΤΙΚΟΣ: όταν η συγκέντρωση των IgG κατά του H. pylori στο δείγμα είναι > 10 AU/mL (για παιδιατρικά δείγματα)
> 15 AU/ml (για ενήλικες ασθενείς)
ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ: όταν η συγκέντρωση των IgG κατά του H. pylori είναι< 5 AU/mL.
ΑΜΦΙΒΟΛΟΣ: όταν η συγκέντρωση βρίσκεται μεταξύ των δύο αυτών τιμών. Σε μία τέτοια περίπτωση σας συμβουλεύουμε να επαναλάβετε την ανάλυση εις διπλούν.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Οροί που έχουν συλλεχθεί κατά την πρώιμη οξεία φάση της λοίμωξης, μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα με αυτή την μέθοδο.
Οροί ισχυρά λιπαιμικοί, αιμολυτικοί ή θερμικά αδρανοποιημένοι, μπορεί να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα και ως εκ τούτου δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.
Όπως συμβαίνει με όλα τα τεστ σε ορούς, τα αποτελέσματα πρέπει να συνεκτιμούνται μαζί με άλλα δεδομένα που προέρχονται κλινικές και διαγνωστικές αναλύσεις.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Η αναλυτική ειδικότητα του κιτ Enzywell H. Pylori IgG εκτιμήθηκε με ένα τεστ αναστολής. Στα δείγματα ορού των ασθενών προστέθηκαν Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni και E. coli. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς και εκείνων που περιείχαν τα παραπάνω αντιγόνα. Ως εκ τούτου συμπεραίνεται ό,τι το παρόν τεστ είναι ειδικό για τα αντισώματα IgG κατά του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε κλινικό πειραματισμό που έγινε σε νοσοκομειακό εργαστήριο, αναλύθηκαν 199 δείγματα, εκ των οποίων 58 προήρχοντο από το Τμήμα Γαστρεντερολογίας. Από αυτά 138 δείγματα αποδείχθηκαν θετικά. Τα δείγματα αναλύθηκαν και με την μέθοδο Western Blot, που θεωρείται ως η μέθοδος αναφοράς.

Αποτελέσματα

		ΑΝΑΦΟΡΑ	
		+	**-**
DIESSE	**+**	**132**	**6**
	-	**1**	**60**

Το κιτ Helicobacter pylori παρουσίασε 6 ψευδώς αρνητικά και 1 ψευδώς θετικό.
Η ευαισθησία και η ειδικότητα αποδείχθηκαν 99,2% και 90,9% αντίστοιχα.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά τη διάρκεια ανάλυσης που έγινε με 3 διαφορετικές παρτίδες

Cut Off n=16	*Παρτίδα 78*	*Παρτίδα 79*	*Παρτίδα 80*
Ο.Π..	0.419	0.608	0.6
CV%	12	15	10

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

	AU/ml				
Δείγμα	**Ανάλ.I**	**Ανάλ.II**	**Ανάλ.III**	**Μ. Τιμή**	**CV%**
PYG1	6.2	7	6.1	6.4	8
PYG2	24.8	26.1	23.9	24.9	4
PYG3	81.3	88.4	84.8	84.8	4

16. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	**ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ**	**ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ**
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά.	Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβατε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε των κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).
		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβατε το τεστ..
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος
	Ανεπαρκής έκπλυση	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά
	Λανθασμένη αναρρόφηση	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.
	Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται με πολύ αργό ρυθμό	Να αποφεύγετε την ξήρανση του πλακιδίου μετά την έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια
	Υπάρχουν φυσαλίδες αέρα	Να αποφεύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων κατά την αναρρόφηση.
	Η οπτική διαδρομή δεν είναι διαυγής	Ελέγξτε αν η φωτεινή πηγή είναι καθαρή. Καθαρίστε το πλακίδιο με ένα χαρτομάντιλο
Ανεπαρκής θερμοκρασία	Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης	Ελέγξτε τον θερμοστάτη και τον χρόνο επώασης.
		Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης
	Η ποσότητα του υποστρώματος που έχει προστεθεί, δεν είναι αρκετή.	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας

17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 **(Español)**

1. INDICACIONES

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

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

In 1983, Warren y Marshall identificaron, en pacientes afectados por gastritis, un nuevo patógeno bacterial gram-negativo llamado Helicobacter pylori. Luego se hicieron varios estudios para aclarar la relación entre la infección bacterial y patologías gástricas crónicas. Se demonstró que el patógeno se asocia a la úlcera péptica, a la gastritis crónica de tipo B, y a la duodenitis. Se demostró que, en pacientes afectados por gastritis, la eliminación de la bacteria conducía a la curación de la lesión anatómica.
Los procedimientos de diagnóstico dirigidos a la revelación del organismo preveen normalmente métodos invasivos (gastroscópicos) para la recolección de una muestra bióptica.
Se observa de todas formas en el paciente infectado, una respuesta inmune específica. El test serológico reprresenta por eso un válido método alternativo con respecto a la técnica invasiva bióptica. Los niveles de las IgG aumentan durante el curso de la infección y se mantienen costantes en el tiempo hasta que la infección no sea eliminada. La eficacia de la terapía anti-microbiana puede por eso ser monitorizada a través de las modificaciones en los niveles de los anticuerpos específicos. La determinación de las IgA es complementaria a la de las IgG. Ya que en algunos casos la concentración de las IgA en los pacientes tractados diminuye más rápidamente con respeto a las IgG, puede ayudar en el follow-up de los pacientes. Por motivos desconocidos, alrededor del 2% de sueros son positivos sólo en el nivel de las IgA.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). El antígeno está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.
Después de varios lavados para eliminar las proteinas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgG marcados con peroxidasa.
El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el substrato para la peroxidasa. La densidad del color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero. Cuando la reacción enzimática está interrumpida por adición de una solución de ácido sulfúrico la coloración amarilla que se desarrolla se puede facilmente leer en un lector para microplacas ELISA.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de virus de Helicobacter pylori
Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (P, seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL
Contenido: Suero humano a concentración conocida de anticuerpos anti- Helicobacter pylori, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adiciona

Los 5 calibradores tienen las siguientes titulaciones expresadas en Unidades Arbitrarias/ml:
Cal 1 5 UA/ml (Calibratore Negativo),
Cal 2 (Cut-off Pediátrico) 10 UA/m
Cal 3 (Cut-off Adultos) 15 UA/ml
Cal 4 50 UA/ml

Cal 5 100 UA/ml
Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL
Contenido: anticuerpos monoclonales humanos anti IgG conjugados marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Solución salina tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Para la dilución de las muestras de suero.
Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H_2O_2 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Solución de H_2SO_4 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).
BOLSA DE PLÁSTICO (1).

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

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

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

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

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

6. PRECAUCIONES DE USO

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

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

origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

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

Informaciones de Salud y Seguridad:

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

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

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta**. **Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" (“efecto filo”) que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador**.** Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO_2.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación micróbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
    - instalación y requisitos específicos
    - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
    - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
    - mantenimiento y servicio técnico

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

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

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
-

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, (se utilizará sólo para el substrato).
Dispensar 100 µL de calibradores SIN DILUIR en los pocillos libres, posiblemente en duplicado, y 100 µL de muestra diluida en los pocillos restantes.
Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.
Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.
Leer la Absorbancia (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min. Leer otra vez a 405 nm si se encuentran D.O. de valor superior a 2.000.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

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

Incubar 45 min. a 37°C

Lavar 4 veces (300 µL)

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

Incubar 45 min. a 37°C

Lavar 4 veces (300 µL)

STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

Incubar 15 min. a T.A.

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-

Leer la absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

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

10. VALIDACIÓN DEL TEST

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

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

1. Resultados cualitativos

El Cut-off de los sueros de adultos corresponde al Calibrador 3.
El Cut-off de los sueros pediátricos corresponde al Calibrador 2.
Calcular la relación entre el valor medio de O.D. de la muestra examinada y lo del Cut-off (INDEX).

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2.

Dudoso: ± 20% del cut-off.

No-inmune: si la concentración es < 0.8.

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

2. Resultados semicuantitativos

Reportar en gráfico las D.O. de los calibradores, subtraídas desde la D.O. del blanco, en función del título de cada calibrador.
Obtener el título correspondiente de la maestra examinada por interpolación.
NOTA: Ejecutar una curva estándar para cada serie.
Si la D.O. de una muestra o calibrador es más de 2,0, leer a 405 nm y mutiplicar el valor por 3.
La inmunidad se puede interpretar como sigue:
INMUNE: cuando la concentración de IgG anti-H. pylori en la muestra es > 10 UA/mL (para pacientes pediátricos)
> 15 UA/ml (para pacientes adultos)
NO INMUNE: cuando la concentración de IgG anti-H. pylori es < 5 UA/mL.
DUDOSO: cuando el valor está entre los dos valores. En este caso se aconseja repetir la determinación en doble prueba.

12. LIMITACIONES

Sueros recolectados durante la fase aguda precoz de la infección podrían resultar negativos con esta técnica.
Su eros fuertemente lipémicos, hemolizados o inactivados con calor, pueden dar lugar a resultados falsos y no deberían ser utilizados.
Como para todos los tests serológicos, el resultado debe ser de todas formas evaluado junto con otros datos clínicos y de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

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

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS

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

Resultados

		REFERENCIA	
		+	**-**
DIESSE	**+**	**132**	**6**
	-	**1**	**60**

El kit Helicobacter pylori dio 6 falsos negativos y 1 falso positivo.
La sensibilidad y la especificidad resultaron respectivamente 99.2% y 90.9%.

15. PRECISIÓN

Precisión intra - ensayo serie ejecutada sobre 3 lotes diferentes

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

Precisión en series diferentes

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

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

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

17. BIBLIOGRAFÍA

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

INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 **(Français)**

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE ET SEMI-QUANTITATIVE DES ANTICORPS IgG ANTI-HELICOBACTER PYLORI DANS LE SERUM HUMAIN.

2. INTERET CLINIQUE

En 1983, Warren et Marshall découvrirent un nouvel agent pathogène bactérien gram-négatif, appelé *Helicobacter pylori*, chez les patients souffrant de gastrite. Ensuite, plusieurs études ont été effectuées, afin d'éclaircir le lien existant entre l'infection bactérienne et les pathologies gastriques chroniques. Il a été démontré que cet agent pathogène est associé dans l'ulcère peptique de type B, la gastrite chronique, la dyspepsie non ulcéreuse et la duodénite. Il a été prouvé que la rechute, chez les patients souffrant de gastrite, est associée à l'infection par *l'H. pylori*, alors que l'élimination de la bactérie réduit l'incidence de la rechute .

Les procédés diagnostiques utilisés pour la détermination de l'agent pathogène comportent généralement des techniques invasives (gastroscopie) pour le prélèvement d'une biopsie.

Il est possible d'observer, chez le patient atteint, une réponse immunologique spécifique, et le test sérologique représente donc une méthode alternative valable par rapport aux techniques invasives habituelles. Les niveaux des IgG augmentent en cours d''infection et ils diminuent progressivement par la suite. L'efficacité de la thérapie antibactérienne peut être contrôlée à travers l'évolution du niveau des anticorps spécifiques.

3. PRINCIPE

Le test se base sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigène est lié à la phase solide (puits de la barrette 1x8). A travers l'incubation dans le sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène. Après des lavages permettant d'éliminer les protéines qui ne se sont pas liées, on effectue l'incubation avec le conjugué se constituant d'anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase.

Le conjugué qui ne s'est pas lié est éliminé et l'on ajoute le substrat. La couleur qui apparaît dépend de la concentration en anticorps spécifiques dans le sérum examiné. Quand la réaction enzymatique est interrompue par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique, la couleur jaune qui apparaît se lit facilement avec le lecteur de microplaques.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 96 réactions.
- **Porter les réactifs à température ambiante avant l'utilisation.**

MT PLATE MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec des antigènes spécifiques de l'H. pylori

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (P, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice. Chasser l'air du sachet et le fermer en exerçant une pression sur la fermeture.

CAL CALIBRATEURS 5 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgG anti-H. Pylori, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

Les 5 calibrateurs ont les valeurs suivantes, exprimées en unités arbitraires/ml

Cal. 1	5 UA/ml (Calibrateur Négatif)
Cal. 2 (Seuil Pédiatrique)	10 UA/ml
Cal. 3 (Seuil Adulte)	15 UA/ml
Cal. 4	50 UA/ml
Cal. 5	100 UA/ml

Couleur : la couleur des calibrateurs dépend de la concentration en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 16 mL
Composition : Anticorps monoclonaux anti-IgG marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox..
Préparation : Prêt à l'emploi.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***LOTS INTERCHANGEABLES***
Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5 % de brij.
Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.
En présence de cristaux : chauffer la solution **à 37 °C** pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

SAMP DIL 2 DILUANT 2 (PF93611) 1 x 100 mL ***LOTS INTERCHANGEABLES***
Pour diluer les échantillons de sérum.
Composition : Solution protéique, additionnée d'azide de sodium 0.09 % et de méthylorange en guise de colorant.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL Prêt à l'emploi ***LOTS INTERCHANGEABLES***
Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/ml) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H_2SO_4 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL ***LOTS INTERCHANGEABLES***
Composition : H_2SO_4 (à 0.3 mol/l) en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)
FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à >= 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à jeter
- Compte-minutes
- Solution 5 % de sodium hypochlorite
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à 2-8 °C. La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette apposée sur la confection.

Les réactifs ont une stabilité limitée après l'aperture et/ou la préparation.

REACTIF	**CONDITIONS**
MICROPLAQUE	6 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène.
CALIBRATEURS	6 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	6 semaines à 2/8 °C.
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.
DILUANT	jusqu'à péremption à 2/8 °C.
TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8 °C, 5 jours à 15/30 °C.
SOLUTION D'ARRET	jusqu'à péremption à 2/8 °C.

6. PRECAUTIONS D'UTILISATION

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.

ATTENTION :
Ce kit contient des matériaux d'origine humaine. Bien que tous les produits d'origine humaine aient subi un contrôle de dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'Ag HBs en utilisant des méthodes approuvées par la FDA, ils doivent cependant être maniés comme étant des produits potentiellement infectieux.

Elimination des résidus: les échantillos de serum et les reactifs usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS POUR LA SECURITE PERSONNELLE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Porter des gants à jeter et des protections pour les yeux quand on manie des échantillons et pendant le test. Se laver soigneusement les mains une fois que le test est terminé.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
   a) Le tampon de lavage contient des détergents
   b) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol
   c) Le substrat est acide.
   d) Les contrôles contiennent de l'azide de sodium (0.09 %). Les azides peuvent réagir avec les métaux des canalisations et donner ainsi naissance à des composés explosifs.
   En cas de contact d'un réactif avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Les instruments que ne sont pas à jeter doivent être stérilisés après l'emploi, de préférence en autoclave pendant 1 h à 121 °C. Les matériaux à jeter doivent être mis en autoclave ou incinérés.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
5. Les matériaux liquides à jeter, neutralisés avec une solution alcaline, doivent être désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 1 % au moins. Une exposition à l'hypochlorite de sodium 1 % pendant 30 minutes suffit pour garantir une désinfection efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1 %), avant de continuer le test. En présence d'un acide, on pourra utiliser l'hypochlorite de sodium seulement après avoir essuyé la zone. Tous les matériaux utilisés pour nettoyer un renversement accidentel doivent être éliminés comme étant potentiellement infectieux.

AVERTISSEMENTS ANALYTIQUES

1. Porter tous les réactifs et les échantillons à la température ambiante (18-30 °C) avant l'emploi. Remettre les réactifs à la température de conservation immédiatement après l'emploi. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit pas descendre au dessous de 35 °C ni au dessus de 39 °C. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après l'avoir laissé 30 minutes à la température ambiante.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter la contamination microbienne des réactifs parce que la validité peut se réduire et que les résultats peuvent être erronés.
3. Ne pas changer le procédé, ni remplacer les réactifs avec ceux d'autres producteurs ou d'autres lots, à moins qu'il ne soit précisé que le réactif est interchangeable parmi différents lots. Les temps d'incubation ne doivent pas être réduits.
4. Toute la verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « dédiées ».
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec le couvre-plaque et incubées à 37 °C ou au bain-marie. Autrement, on peut faire incuber les plaques dans une analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO_2.
10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé, ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec des instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement les modes d'emploi des instruments utilisés ; en particulier, il faut prêter attention :
    - à l'installation et aux avertissements spécifiques
    - aux principes opérationnels, aux instructions, précautions, risques
    - aux spécifications du producteur et aux performances de l'instrument
    - à la maintenance et à l'assistance technique

7. TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION

L'échantillon peut se constituer par sérum prélevé normalement en observant toutes les précautions prévues dans le laboratoire.
Les sérums frais peuvent être utilisés encore au bout de 4 jours à +2…+8 °. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de troi décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant l'utilisation.
Les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Si la contamination est perceptible à l'œil nu, l'échantillon doit être éliminé. En outre, il n'est pas possible d'utiliser les échantillons fortement lipémiques, ictériques, hémolysés ou contaminés.
L'échantillon ne peut pas se constituer de plasma humain.

8. PROCEDURE

Préparation :
- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparation de la solution tamponnée de lavage :
  Diluer la solution **de lavage concentrée** (par exemple : 100 ml + 900 ml d'eau distillée).

Exécution
Diluer les échantillons 1 :101 en versant 10µl de sérum dans 1 mL de diluant ; distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double). Mettre les calibrateurs NON dilués dans une barrette, si possible en double (100 µl/puits). Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits. Couvrir les puits avec la feuille de protection.
Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver pendant 30 secondes (300 µL), répéter la phase de lavage 4 fois. Ajouter 100 µl du conjugué dans chaque puits.
Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver la plaque encore 4 fois comme cela est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt.
Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes. Lire de nouveau la D.O. s'il y a des D.O. supérieures à 2000.

9. SCHEMA D'ANALYSE

1e ETAPE	Mettre 100 µl de sérum dilué/contrôles dans les puits de la barrette.
	Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)
2e ETAPE	Mettre 100 µl de conjugué dans les puits.
	Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.
	Laver pendant 30 seconde à 4 reprises (300 µL)
3e ETAPE	Mettre 100 µl de substrat dans les puits. Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.
4e ETAPE	Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
	Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.

10. VALIDATION DU TEST

Soustraire la valeur du blanc (<= 0.150) de toutes les autres valeurs. La densité optique du calibrateur 3 doit être >= 0,2. Le calibrateur 5 doit avoir une D.O. >= 1,5-fois la D.O. du calibrateur 3.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats qualitatifs
Le contrôle seuil des sérums adultes correspond au calibrateur 3.
Le contrôle seuil des sérums pédiatriques correspond au calibrateur 2

Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Indice).
L'échantillon est considéré comme étant :

Positif : si le rapport est > 1.2
Incertain: si le rapport est compris 0.8 et 1.2
Négatif : si le rapport est > 0,8

Si le résultat est incertain, refaire le test. Si le résultat est de nouveau incertain, réaliser de nouveaux prélèvements d'échantillons de sang.

Résultats semi-quantitatifs
Lire les absorptions des calibrateurs à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc. Réaliser un graphique avec ces valeurs. On obtient le titre de chaque échantillon en interpolant les D.O.
NOTE : Il faut réaliser une courbe standard à chaque séance.
Si la D.O. d'un sérum ou d'un échantillon est supérieure à 2.0, lire la D.O. à 405 nm et multiplier la valeur par 3.

Le niveau d'immunité peut être interprété comme il est indiqué ci-dessous :
IMMUNE : quand la concentration des IgG anti-H. pylori IgG dans l'échantillon est > 10 UA/ml (chez les sujets pédiatriques) ; >15 UA/ml (chez les sujets adultes)
NON IMMUNE : quand la concentration des IgG anti-H. pylori est < 5 UA/ml
INCERTAIN : quand la valeur est comprise entre les deux valeurs. Dans ce cas, il faut refaire l'essai en double.

12. LIMITES DE LA METHODE

Un sérum obtenu pendant la phase aiguë de l'infection, quand seulement les anticorps IgM sont présents, peut être négatif avec cette méthode.
Les sérums ayant un fort contenu lipémique, hémolysés ou inactivés à la chaleur, peuvent fausser les résultats faux et ils ne doivent pas être utilisés.
Les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés en tenant compte des autres observations.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

La spécificité analytique du kit Enzywell H. Pylori IgG a été évaluée lors d'un test d'inhibition. Nous avons ajouté aux échantillons des patients, les antigènes suivants : Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni et E. coli. On n'a observé aucune différence entre les échantillons de référence et ceux qui contenaient les antigènes. Pourtant, il est possible d'affirmer que la méthode examinée est spécifique pour les anticorps IgG anti-Helicobacter pylori.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

199 échantillons ont été analysés lors d'une expérimentation clinique effectuée dans un laboratoire hospitalier : 58 ont été prélevés du service de gastro-entérologie; 138 sérums étaient positifs. Les échantillons ont également été analysés avec le système Western Blot, considéré en tant que méthode de référence.

Résultats

			REFERENCE	
			+	**-**
DIESSE	**-**	**+**	**132**	**6**
		-	**1**	**60**

Le kit H. Pylori présentait 6 faux négatifs et 1 faux-positif.
La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 99.2 % et de 90.9 %.

15. PRECISION

Précision dans la série effectuée avec 3 lots différents

Seuil n=16	***Lot n° 078***	***Lot n° 79***	***Lot n° 80***
O.D.	0.419	0.608	0.6
CV %	12	15	10

Précision entre séries

	UA/ml				
Echantillon	**I run**	**II run**	**III run**	**Moyenne**	**CV %**
PYG1	6.2	7	6.1	6.4	8
PYG2	24.8	26.1	23.9	24.9	4
PYG3	81.3	88.4	84.8	84.8	4

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	**CAUSES POSSIBLES**	**ACTION/CONTROLE**
Session non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en ordre erroné	Contrôler le processus. Contrôler s'il y a une solution inutilisée. Refaire le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire le mode d'emploi, paragraphe 4).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Session non valable (tous positifs)	Contamination du substrat	Prélever une nouvelle quantité de substrat.
	Lavage insuffisant	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Erreur de pipetage	S'assurer que la pipette fonctionne correctement
	Ajout des réactifs trop long	Eviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d'air	Eviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage.
	Parcours optique pas propre	Contrôler la source lumineuse et la présence d'impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec du papier.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
		Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
	Volume incorrect du substrat ajouté à la plaque	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

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

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 **(Português)**

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

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

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Em 1983, Warren e Marshall identificaram o Helicobacter pylori, um novo patogénio bacteriano gram-negativo, em pacientes com gastrite e esta descoberta conduziu a estudos sobre a relação entre infecção bacteriana e doença gástrica crónica. Concluiu-se que o patogénio está associado a úlcera péptica, gastrite crónica de tipo B e duodenite. Demonstrou-se que, em pacientes com gastrite, a erradicação da bactéria conduziu à cura da lesão anatómica.
Os procedimentos de diagnóstico para a detecção do organismo geralmente envolvem técnicas invasivas (gastroscópicas) para recolha de amostras.
No entanto, verifica-se uma resposta imune específica nos pacientes infectados. O teste serológico representa, assim uma alternativa útil à técnica bióptica invasiva. Os níveis de IgG sobem com a infecção e permanecem constantemente elevados até que a infecção seja eliminada. A eficácia da terapia antimicrobiana pode, por isso, ser monitorizada através de alterações no anticorpo IgG específico.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática).
O antigénio liga-se à fase sólida. As imunoglobulinas são ligadas ao antigénio por incubação com soro humano diluído.
Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto por anticorpos IgG humanos monoclonais marcados com peroxidase.
O conjugado desligado é eliminado e o substrato de peroxidase é adicionado.
A densidade da cor que se desenvolve é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes na amostra de soro. Quando a reacção enzimática é interrompida pela adição de uma solução de ácido sulfúrico, a cor amarela que se desenvolve pode ser facilmente lida usando um leitor de microplacas ELISA.

4. COMPONENTES DO KIT

Os reagentes são suficientes para 96 determinações.
Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 poços cobertos de antigénios de Helicobacter pylori.
Utilização: abra a embalagem no lado oposto ao código (P, seguido do número do lote), que é útil para fins de identificação, retire o suporte e as tiras da embalagem folheada para serem usadas e coloque as tiras não usadas no saco de polietileno com sílica gel, retire o ar e vede premindo o fecho.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL
Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-humanos IgG marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol a 0,05% e Bronidox a 0,02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL
Conteúdo: Soro humano diluído, em concentrações conhecidas de anticorpos para Helicobacter pylori, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com a BSA 1% e azida de sódio a 0,09%. Líquido, pronto a ser usado sem mais diluição.
Os 5 calibradores têm os seguintes títulos expressos em Unidades Arbitrárias/ml:

Calibrador	**Concentração**
Cal 1 (Controlo Negativo)	5 AU/ml
Cal 2 (Directo Pediátrico)	10 AU/ml
Cal 3 (Directo Adulto)	15 AU/ml

Cal 4	50 AU/ml
Cal 5	100 AU/ml

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

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto a usar ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
Um frasco contendo 12ml de tetrametilbenzidina a 0,26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0,01% estabilizado num tampão de citrato a 0,05 mol/L (pH 3,8).

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1x100 mL Para diluição de amostras de soro ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0,09% adicionado de metil-orange como corante.

WASH BUF 10X TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij a 0,5% .
Preparação: dilua o volume necessário na proporção de 1:10 com água destilada para obter o tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, estes devem ser dissolvidos a 37ºC antes da diluição.

H_2SO_4 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602). 1x16 mL ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
H_2SO_4 0,3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).
SACO DE POLIETILENO (1).

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

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.
O prazo de validade está impresso em cada componente e no rótulo da embalagem

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

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

6. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

Para uso diagnóstico in vitro.

Este kit contém materiais de origem humana que foram testados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o material de

origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

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

- Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave bem as mãos quando tiver terminado.
- Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
  i) O tampão de lavagem contém detergentes
  j) O conjugado e os controlos contêm fenol
  k) O substrato é ácido
  l) Os controlos contêm azida de sódio a 0,09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

  Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.
  - Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
  - O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e o ácido hidroclórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.
  - Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1,0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
  - Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com um lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1,0%, por exemplo, antes do trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

PRECAUÇÕES TÉCNICAS

- **Conserve a 2-8°C**
- Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após a utilização**. É importante trabalhar à temperatura correcta. Certifique-se de que o termóstato não desce abaixo de 35ºC nem sobe acima de 39ºC.**
- Abra o saco contendo as tiras pelo menos após 30 minutos à temperatura ambiente.
- Não utilize reagentes além do prazo de validade indicado. Deve evitar-se a contaminação microbiológica de reagentes, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
- Não modifique o procedimento de teste nem substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente, a menos que estejam indicados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
- Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidroclórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
- Evite a utilização de congeladores auto-descongeláveis para armazenamento de amostras.
- Não exponha os reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
- Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
- Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
- Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “sopre” as microplacas.
- Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C num banho de água com um rack ou uma bóia para suportar as placas, se necessário, ou num incubador**.** Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações, consulte o manual de instruções apropriado. Os incubadores de CO_2 não devem ser utilizados.
- Certifique-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa.

- A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.
- O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
- Para cada instrumento utilizado, leia atentamente o manual de instruções do fabricante para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
    - instalação e requisitos particulares
    - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
    - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
    - manutenção e reparação

7. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

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

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

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

Dilua as amostras na proporção de 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço vazio para o branco que será realizado nos passos adequados distribuindo 100 µL de substrato e apenas 100 µL de solução de paragem. Distribua 100 µL de calibradores NÃO DILUÍDOS nos poços de uma tira, de preferência em duplicado e 100 µl da amostras diluída nos restantes poços.
Cubra os poços com filme protector e incube durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes (300 µl) com tempo de enxaguamento na solução de lavagem de 30 segundos para cada ciclo, junte 100 µL de conjugado e incube mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. Lave novamente a placa 4 vezes, como descrito acima. Por fim, adicione o Substrato (100 µL/poço) em cada poço.
Após 15 minutos à temperatura ambiente, pare a reacção enzimática com 100 µL de solução de paragem.
Leia as densidades ópticas (D.O.) a 450 nm ou a 450/620 nm dentro de 30 min. Faça uma nova leitura a 405 nm se a D.O. for superior a 2000.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

Deixe um poço vazio para o branco (A1)

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

10. VALIDADE DO ENSAIO

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

11. RESULTADOS

RESULTADOS SEMIQUANTITATIVOS

a.Subtraia a D.O. do branco de todas as leituras para obter os valores de DO líquidos.
b.Construa a curva de calibragem desenhando num papel milimétrico a DO líquida de cada calibrador contra a sua concentração AU/ml correspondente.
c. Faça a interpolação da DO da amostra líquida na curva de calibragem desenhada para obter a concentração da amostra correspondente.

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

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

O grau de imunidade pode ser interpretado do seguinte modo:

IMUNE: Quando a concentração anti-H. Pylori IgG na amostra for
> 10 AU/ml (para pacientes pediátricos)
>15 AU/ml (para pacientes adultos)
NÃO IMUNE: quando a concentração anti-H. pylori IgG for < 5 AU/mL
DUVIDOSO: se o resultado estiver entre os dois valores. Neste caso, é aconselhável repetir o teste em duplicado.

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

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

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

Positiva: se a relação for > 1,2.
Duvidosa: Se a relação estiver entre 0,8-1,2 (± 20% do valor directo)
Negativa: se a relação for < 0,8.
se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda precoce de infecção pode revelar-se negativa por este procedimento.
Soros altamente lipémicos, ictéricos, hemolizados ou inactivados por calor podem provocar resultados e não devem ser usados.
Como acontece com todos os testes serológicos, os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos e de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

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

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Num teste clínico efectuado num laboratório de hospital, analisaram-se 199 soros humanos, 58 dos quais vieram do Departamento de Gastroenterologia. Do total, 138 deram um resultado positivo.
As amostras foram analisadas no ensaio Western Blot, tendo em conta o método de referência.

Resultados

		REFERÊNCIA	
		+	**-**
Enzywell	**+**	**132**	**6**
	-	**1**	**60**

O kit Enzywell Helicobacter Pylori IgG resulta em 6 falsos negativos e 1 falso positivo.
A sensibilidade e especificidade foram de 99,2% e 90,9%, respectivamente.

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaios efectuada em três lotes diferentes

Valor directo	***Lote N.º 78***	***Lote N.º 79***	***Lote N.º 80***

n=16			
D.O.	0,419	0,608	0,6
CV%	12	15	10

Precisão entre passagens

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

16. SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

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

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

17. REFERÊNCIAS

6. Marshall B.J. and Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet i, 1311 (1984).

7. Jones D.M., Lessels A.M., Eldridge J.: Campylobacter-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. J. Clin. Pathol. 37: 1002 (1984).
8. Blaser M.J.: H. pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. J. Inf. Dis. 161: 626 (1990).
9. Valle J., Sepp,,l,, K., Sipponen P., Kasunen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of H. pylori: a morphometric study. Scand. J. Gastroenterology 26: 1057 (1991).
10. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).

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



DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA) Italy
Tel. 0577-587111