



ENZY-WELL

HELICOBACTER PYLORI IgA

REF 91062 (96 tests)

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

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Eingeführte Änderungen in der vorliegenden Fassung Τροποποιήσεις που εισήχθησαν στην τρέχουσα διόρθωση Cambios introducidos en la revisión actual Modifications apportées à la révision courante Alterações introduzidas na revisão atual	4 – 5



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 EXPLICAÇÃO 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 ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO 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 ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ/ 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 / ΕΓΚΥΠΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃO 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

ENZY-WELL HELICOBACTER PYLORI IgA

REF 91062

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELLE IgA ANTI HELICOBACTER PYLORI NEL SIERO UMANO.

2. INTRODUZIONE

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

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

Si osserva tuttavia nel paziente infetto, una risposta immune specifica. Il test sierologico rappresenta quindi un valido metodo alternativo rispetto alla tecnica invasiva biotica. I livelli delle IgG aumentano durante il corso dell'infezione e si mantengono costanti nel tempo a meno che l'infezione non venga eradicata. L'efficacia della terapia antimicrobica può quindi essere monitorata attraverso le modificazioni nei livelli degli anticorpi specifici. La determinazione delle IgA è complementare a quella delle IgG. Poiché in alcuni casi la concentrazione delle IgA nei pazienti trattati diminuisce più rapidamente rispetto alle IgG, può essere di aiuto nel follow-up dei pazienti.

Per motivi sconosciuti, circa 2% di sieri sono positivi solo nel livello delle IgA.

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 IgA 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 reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12 x 8 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 la sua 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.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-H. Pylori IgA, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT OFF 1x2 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-H. Pylori IgA, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgA umane marcati con perossidasi, contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

IgA CONTROL - IgA CONTROLLO NEGATIVO 1 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano, privo di anticorpi anti-H. pylori IgA, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, 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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUENTE 50X (PF30267) 1 x 4.5 mL Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica contenente Fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:50 nel tampone di lavaggio per avere il diluente pronto all'uso.

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

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H₂O₂ 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

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

Soluzione di H₂SO₄ 0.3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 nm 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 e puntali 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
CONTROLLI	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 IgA	1 settimana a 15/30°C, 8 settimane 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. CONSERVARE A 2-8°C

Attenzione:

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana

deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

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

Avvertenze per la sicurezza personale

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

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

Avvertenze analitiche

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

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).
- Preparare il volume richiesto di diluente dei campioni aggiungendo una parte del Diluent 50x a 49 parti del tampone di lavaggio diluito (esempio 2 mL + 98 mL).

Lasciare un pozzetto libero per il bianco (si userà solo per il substrato).

In uno strip porre i controlli (NON DILUITI) (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente; distribuire 100 µL per pozzetto (meglio in doppio).

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi (300 µL) ciascuno si aggiungono 100 µL del coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato (100 µL/pozzetto). Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

STEP 1 Mettere 100 µL di siero diluito/sieri di controllo nei pozzetti dello strip.

incubare 45 min. a 37°C

lavare 4 volte (300 µL)

STEP 2 Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto

incubare 45 min. a 37°C

lavare 4 volte (300 µL)

STEP 3 mettere 100 µL di Substrato per pozzetto

incubare 15 min. a t.a.

STEP 4 aggiungere 100 µL di Stop Solution

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. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off quando analizzato in triplicato devono essere entro il 25% del valore medio. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere ≤ 0.6 . La D.O. del cut-off deve essere ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

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

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

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

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

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

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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 IgA 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 IgA anti-*Helicobacter pylori*.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita sono stati analizzati 171 campioni caratterizzati come positivi e negativi con esame endoscopico. 110 risultavano positivi per la presenza di *H. Pylori* nella biopsia gastrica.

La tabella seguente riassume i dati:

DIESSE	RIFERIMENTO	
	+	-
	+	-
	95	2
	15	59

La sensibilità e la specificità risultavano rispettivamente 86.4% e 96.7%.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

Cut Off n=16	Batch. N. 31	Batch. N. 32	Batch. N. 33
O.D.	0.267	0.472	0.494
CV%	10	14	12

Precisione tra sedute

Campione	AU/ml				
	I run	II run	III run	Media	CV%
PYA1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
PYA2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
PYA3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso, punto 4, 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.

17. BIBLIOGRAFIA

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



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL HELICOBACTER PYLORI IgA

REF 91062

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgA-CLASS ANTIBODIES TO HELICOBACTER PYLORI IN HUMAN SERUM

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

In 1983, Warren and Marshall (1) 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 (2). The pathogen has been shown to be It has been demonstrated that in patients with gastritis, eradication of the bacteria led to healing of the anatomical lesion (4).

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. The determination of the IgA antibody levels is complementary to that of the IgG. As the IgA levels decrease more rapidly than the IgG in some patients undergoing treatment, this parameter can be useful in the follow-up of patients.

For the same reason, a low IgA level in IgG-positive patients may indicate a past infection.

For unknown reasons, about 2% of serum samples are positive only for IgA (5,6).

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (5).

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 anti-human IgA monoclonal antibodies labelled with peroxidase.

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

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

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

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

MT PLATE MICROPLATE 12 x 8 wells coated with *Helicobacter pylori*.

Use: open the package at the opposite end from the code (P, followed by the lot number) which is useful 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.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-H. Pylori IgA, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF CONTROL 1 x 2 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-H. Pylori IgA, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

CONJ CONJUGATE 1x16 mL

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

IgA CONTROL - IgA NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1 x 1.6 mL

Contents: Human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

WASH BUF 10x 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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUENT 50X (PF30267) 1x4.5 mL For dilution of serum samples.

Contents: Proteic solution with Phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Preparation: Dilute the required volume 1:50 in the washing buffer to obtain the diluent ready for use.

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

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

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

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

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.

- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 nm or at 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 225-375 µl
- Distilled or deionized 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
Controls	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
IgA Sample Diluent	1 week at 15/30°, 8 weeks at 2/8°C
Wash Buffer	ready for use, 2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only.

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

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

Health and Safety Information

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

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.

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

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. 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).
- Prepare the required diluent for samples by adding 1 part of IgA Diluent 50x to 49 parts of the diluted washing buffer (example: 2 mL + 98 mL of diluted washing buffer).

Leave one well empty for the blank (only the substrate will be used). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control. Dilute the samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended).

The wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µL), add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed (100 µL/well).

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

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1	Place 100 µL of diluted sample//control sera in the wells of the strips.
--------	--

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 blank (≤ 0.150) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum when tested in triplicate must be within 25% of the mean value. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-Off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be ≤ 0.6 . The O.D. of the cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

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

Positive: if the ratio is > 1.2 .

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

Negative: if the ratio is < 0.8 .

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

12. LIMITATIONS OF THE 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 IgA 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 IgA.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical evaluation, 171 samples were tested after characterization as positive or negative by endoscopic examination: 110 proved positive for the presence of H. Pylori in the gastric biopsy.

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	95	2
	-	15	59

The sensitivity and specificity were 86.4% and 96.7% respectively.

15. PRECISION

Within run Precision on three different batches

Cut Off $n=16$	Batch. N. 31	Batch. N. 32	Batch. N. 33
O.D.	0.267	0.472	0.494
CV%	10	14	12

Between run Precision

Campione	AU/ml				
	I run	II run	III run	Media	CV%
PYA1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
PYA2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
PYA3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

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 package insert, paragraph 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., Seppälä K., Sipponen P., Kasanen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of *H. pylori*: a morphometric study. *Scand. J. Gastroenterology* 26: 1057 (1991).
6. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem.* 22: 1243 (1976).



GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZY-WELL HELICOBACTER PYLORI IgA

REF 91062

(Deutsch)

1. VERWENDUNGSZWECK

ELISA-Assay zur Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen Helicobacter pylori in humanem Serum.

2. PHYSIOLOGIE

1983 entdeckten Warren und Marshall (1) 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 (2). 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 (4).

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 biopsischen 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. Die IgA-Antikörperkonzentrationen werden komplementär zu den IgG-Antikörperkonzentrationen bestimmt. Da die IgA-Werte bei sich in Behandlung befindlichen Patienten schneller abfallen als die IgG-Werte, kann dieser Parameter bei Nachuntersuchungen nützlich sein.

Aus dem gleichen Grund kann eine niedrige IgA-Konzentration bei IgG-positiven Patienten auf eine zurückliegende Infektion hinweisen.

Aus unbekannten Gründen sind ca. 2 % der Serumproben nur für IgA positiv (5,6).

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (5).

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 IgA, 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.

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.

CONJKONJUGAT 1x16 mL

Inhalt: Monoklonale Antikörper gegen humanes IgA, gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0.05% Phenol und 0.02% Bronidox. Gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

CONTROL + POSITIVKONTROLLSERUM 1 x 1.6 mL

Inhalt: Verdünntes Humanerum mit bekannter Anti-Helicobacter pylori IgA-Konzentration in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

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

IgA CONTROL - IgA-NEGATIVKONTROLLE 1 x 1.6 mL

Inhalt: Humanerum in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

CUT-OFF CONTROL CUT-OFF KONTROLLSERUM 1x 2 mL

Inhalt: Verdünntes Humanserum mit bekannter Anti-Helicobacter pylori IgA-Konzentration in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

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).

IgA SAMP DIL 50x IgA VERDÜNNUNGSMITTEL 50X (PF30267) 1 x 4.5 mL Für die Verdünnung von Proben.

Inhalt: Proteinlösung mit 0.05% Phenol und 0.02% Bronidox.

Rekonstitution: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:50 mit Waschpuffer, um das gebrauchsfertige Diluent herzustellen.

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.

H₂SO₄ 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602) 1x16 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: H₂SO₄ 0.3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

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 Dispenservolumen 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
KONTROLLSERUM	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
IgA VERDÜNNUNGSMITTEL	1 Woche bei 15-30°C, 8 Wochen bei 2-8°C
WASCHPUFFER	gebrauchsfertig, 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 Reagenzien 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.
- 1. 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 CO₂ Inkubatoren.
- 1. 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.
- 2. Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.
- 3. Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigt werden
- 4. 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 H₂O).
- Bereiten Sie die benötigte Menge Diluent vor: Verdünnen Sie 1 Teil IgA Diluent (50x) mit 49 Teilen verdünntem Waschpuffer (Beispiel: 2 ml Diluent + 98 ml verdünnter Waschpuffer).

PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

Lassen Sie die erste Well für den Substratleerwert frei (nur das Substrat wird verwendet). 100 µl unverdünnte Positiv-, Negativkontrolle (Doppelbestimmung) und unverdünntes Cut-Off-Serum (Dreifachbestimmung) in je eine Well pipettieren. (Das Minimum sind 1 Negativkontrolle, 2 Cut-Off und 1 Positivkontrolle.) Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells (Doppelbestimmungen werden empfohlen).

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 in alle Wells pipettieren (außer Substratleerwert). Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 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 Extinktion (OD) innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm oder 450/620 nm messen.

9. TESTSCHEMA

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

- 100 µl unverdünntes Kontrollserum und verdünnte (1:101) Proben in die entsprechenden Wells pipettieren.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 µl).
- Zu allen Wells außer Well A1 100 µl Konjugat zufügen.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 µl).
- 100 µl Substrat in alle Wells (einschließlich Well A1) pipettieren.
- 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- 100 µl Stopplösung in alle Wells (einschließlich Well A1) pipettieren.
- 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

Die OD des Substratleerwerts muss ≤ 0.150 sein.

Subtrahieren Sie den Substratleerwert von allen Extinktionen. Die Extinktion der Einzelwerte des Cut-Off-Serums muss bei einer Dreifachbestimmung innerhalb von 25% des Extinktionsmittelwertes liegen. Abweichende Werte werden ggf. eliminiert, und der Mittelwert wird anschließend neu berechnet. Die Extinktion der Positivkontrolle muss mindestens das 1,5fache der Extinktion des Cut-Off-Serums betragen, die Extinktion der Negativkontrolle muss ≤ 0.6 fache des Cut-Off-Serums betragen. Die OD des Cut-Off muss ≥ 0.2 bei 450 nm und ≥ 0.16 bei 450/620 nm sein.

11. QUALITATIVE ERGEBNISSE

Subtrahieren Sie die Blank ODs von allen übrigen Messungen.

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

positiv: wenn die Ratio > 1.2 ist,

zweifelhaft: wenn die Ratio zwischen 0.8 und 1.2 (Cut-Off $\pm 20\%$) 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

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 *Helicobacter pylori* IgA 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* IgA ist.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer klinischen Studie wurden 171 Proben getestet, nachdem sie durch endoskopische Untersuchung als positiv oder negativ gekennzeichnet wurden. 110 Proben enthielten in der Magenbiopsie *Helicobacter pylori*.

		REFERENZ	
		+	-
Diesse	+	95	2
	-	15	59

Die Methode bietet 86.4% Sensitivität und 96.7% Spezifität.

15. PRÄZISION

Präzision in der Serie mit drei verschiedenen Lots

Cut-Off n=16	Lot 31	Lot 32	Lot 33
O.D.	0.267	0.472	0.494
CV%	10	14	12

Interassay-Präzision

	AU/ml				
Probe	I. Serie	II. Serie	III. Serie	Mittel	CV%
PYA1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
PYA2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
PYA3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

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	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.

	der Wells	
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschrift. 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., Seppälä, 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

ENZY-WELL
IgA ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ

REF 91062

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ IgA 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 ότι το παθογόνο συνδυάζεται με το πεπτικό έλκος, με την χρόνια γαστρίτιδα του τύπου B και με το έλκος του δωδεκαδάκτυλου. Αποδείχθηκε επίσης ότι 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 λοίμωξη εξαλειφθεί. Μέσω λοιπόν της διακύμανσης της συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων μπορεί να εξακριβωθεί η αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής θεραπείας. Ο προσδιορισμός των IgA συμπληρώνει αυτόν των IgG. Επειδή, σε μερικές περιπτώσεις, η συγκέντρωση των IgA στους υπό θεραπεία ασθενείς, μειώνεται με μεγαλύτερη ταχύτητα από εκείνη των IgG, μπορεί να προσφέρει σημαντική βοήθεια στο follow-up των ασθενών.

Για άγνωστη αιτία, περίπου το 2% των ορών αποδεικνύεται θετικό μόνο ως προς τα IgA.

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 ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα IgA 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 ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ.

- Να φέρνεται 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 πολυθénιο, που περιέχει γέλη πυριτίας τις ταινίες που δεν χρησιμοποιήσατε, αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε την πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος.

CONTROL + ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΘΕΤΙΚΟΣ 1 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgA 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 αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONTROL CUT- OFF ΕΛΕΓΧΟΣ CUT-OFF 1 x 2 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgA 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 αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 1 x 16 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgA σεσημασμένα με υπεροξειδάση σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει φαινόλη 0.05% και Bronidox 0.02%. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

IgA CONTROL - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgA. 1 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός χωρίς αντισώματα IgA κατά του *H. pylori*, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1x100 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 αραιώση.

IgA SAMP DIL 50x IgA ΔΙΑΛΥΤΗΣ 50X (PF30267) 1 x 4.5 mL Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων.

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα με φαινόλη 0.05% και Bronidox 0.02%.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:50 στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης για να παρασκευάσετε τον διαλύτη έτοιμο για χρήση.

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1 x 12 mL Έτοιμο για χρήση. **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0.26 mg/mL και H₂O₂ 0.01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Διάλυμα H₂SO₄ 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. $\geq 2,000$)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μ l
- 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 μ l 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 σταθερότητας μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ	6 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο
ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ	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 IgA	1 εβδομάδα σε 15/30°C, 8 εβδομάδες σε 2/8°C
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ 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 αντιδραστήρια 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 σχηματίζει ισχυρά εκρηκτικά αζιδικά ιζήματα μετάλλων:
Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε 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 θεϊκό 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, ξεπλύνετε 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 πάλη τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ότι 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 χέιλος 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 CO₂.

23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι 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).
- Προετοιμάστε τον απαιτούμενο όγκο διαλύτη δειγμάτων προσθέτοντας ένα μέρος Diluent 50x σε 49 μέρη του αραιωμένου διαλύματος έκπλυσης (π.χ.: 2 mL + 98 mL)

Αφήστε ελεύθερη μία κυψελίδα για το τυφλό δείγμα (θα χρησιμοποιηθεί μόνο για το υπόστρωμα).

Ρίξτε σε μία ταινία τους ορούς ελέγχου (OXI ΑΡΑΙΩΜΕΝΟΥΣ) (100 μL ανά κυψελίδα). Η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα είναι 1 ορός ελέγχου αρνητικός, 2 cut-off και 1 θετικός. Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 μL ορού σε 1 mL διαλύτη. Ρίξτε 100 μL σε κάθε κυψελίδα (συνιστάται η εκτέλεση να γίνει εις διπλούν).

Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις, διάρκειας 30 δευτερολέπτων η κάθε μία (300 μl) προσθέστε 100 μL συζυγούς σε κάθε μία κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C, καλύπτοντάς τις με την προστατευτική ταινία. Ξεπλύνετε 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 την Απορρόφηση (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.

9. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

STEP 1 Ρίξτε 100 μL αραιωμένου ορού/ορού ελέγχων στις κυψελίδες τις 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

Αφαίρεστε την τιμή του τυφλού (≤ 0.150) από όλες τις άλλες τιμές. Οι τιμές σε Ο.Π. του ορού ελέγχου Cut-off, όταν αναλύεται εις τριπλούν, πρέπει να κυμαίνονται μέσα στο 25% της μέσης τιμής. Απορρίψτε την μη φυσιολογική τιμή και υπολογίστε και πάλι την μέση τιμή. Η θετικός ορός ελέγχου πρέπει να έχει Ο.Π. ίση με 1,5 φορά τουλάχιστον την τιμή του Cut-off. Ο λόγος μεταξύ Αρνητικού ορού και Cut-off πρέπει να είναι ≤ 0.6 . Η Ο.Π. του cut-off πρέπει να είναι ≥ 0.2 στα 450 nm και ≥ 0.16 στα 450/620 nm.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ**Ποιοτικά αποτελέσματα**

Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της τιμής της Ο.Π. του υπό εξέταση δείγματος και εκείνης του Cut-off (INDEX). Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2 .

Αμφίβολο: $= \pm 20\%$ του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8 .

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο επαναλάβετε την αιμοληψία.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Οροί ισχυρά λιπαιμικοί, με αιμόλυση ή θερμικά αδρανοποιημένοι, μπορεί να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Γι' αυτό και 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 kit Enzywell H. Pylori IgA 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 ότι το παρόν τεστ είναι ειδικό για τα αντισώματα IgA κατά του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε κλινικό πειραματισμό αναλύθηκαν 171 δείγματα που χαρακτηρίστηκαν θετικά και αρνητικά με μία ενδοσκοπική εξέταση. Από αυτά 110 αποδείχθηκαν θετικά λόγω της παρουσίας του *H. Pylori* κατά την γαστρική βιοψία.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

		ΑΝΑΦΟΡΑ	
		+	-
DIESSE	+	95	2
	-	15	59

Η ευαισθησία και η ειδικότητα αποδείχθηκαν 86,4% και 96,7% αντίστοιχα.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά τη διάρκεια ανάλυσης που έγινε με 3 διαφορετικές παρτίδες

Cut Off n=16	Παρτίδα 31	Παρτίδα. 32	Παρτίδα. 33
Ο.Π.	0.267	0.472	0.494
CV%	10	14	12

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

Δείγμα	AU/ml				
	Ανάλ.Ι	Ανάλ.ΙΙ	Ανάλ.ΙΙΙ	Μ. Τιμή	CV%
PYA1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
PYA2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
PYA3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

16. ΟΛΗΓΟΣ 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. Επαναλάβετε 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). Επαναλάβετε 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., Seppälä, K., Sipponen P., Kasunen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of H. pylori: a morphometric study. Scand. J. Gastroenterology 26: 1057 (1991).
7. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).



INSTRUCCIONES DE USO
ENZY-WELL
HELICOBACTER PYLORI IgA

REF 91062

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LAS IgA ANTI HELICOBACTER PYLORI EN SUERO HUMANO.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

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

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

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

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

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

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos con *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.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 1.6 mL

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

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1 x 2 mL

Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-H. Pylori IgA, en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional (Calibrador 0).

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales anti IgG humanos marcados con peroxidasa, conteniente fenol 0.05% y Bronidox 0,02%. Listo para su uso sin dilución adicional.

IgA CONTROL - IgA CONTROL NEGATIVO 1 x 1.6 mL

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

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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUYENTE 50X (PF30267) 1 x 4.5 mL. Para diluir las muestras.

Contenido: Solución de proteínas conteniente Fenol al 0.05% y Bronidox 0.02%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:50 en el tampón de lavado para obtener el diluyente listo para su uso.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1 x 12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

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

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

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.

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

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
SUEROS DE CONTROL	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 IgA	1 semana a 15/30°C, 8 semanas a 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días a 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C.

6. PRECAUCIONES DE USO

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

Cuidado:

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

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

Informaciones de Salud y Seguridad:

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

Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.

3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1.0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

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

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes.

Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación que pueden causar pérdida de la actividad del anticuerpo y proveer resultados erróneos. Agitar con cuidado las muestras desheladas antes de la titulación. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.

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

El test no se puede aplicar el test a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO DEL TEST

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparar el volumen requerido de diluyente para las muestras añadiendo 1 parte de Diluent 50x a 49 partes del tampón de lavado diluido (ejemplo: 2 mL + 98 mL)

Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco (se utilizará sólo para el substrato).

Colocar los controles SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 control negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente; dispensar 100 µL para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba).

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 (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida//sueros de control en los pocillos.

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 adsorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6 . La D.O. del cut-off debe ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Calcular la relación entre el valor de O.D. de la muestra y lo del Cut-off (INDEX).

La muestra se considera:

Immune: si la concentración es > 1.2 .

No-immune: si la concentración es < 0.8 .

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

12. LIMITACIONES

Sueros fuertemente lipémicos, hemolizados u inactivados con el 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 IgA ha sido evaluada con un test de inhibición. A las muestras de suero se añadieron *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni* y *E. coli*. No se observaron diferencias entre las muestras de referencia y aquellas que contienen los antígenos descritos anteriormente. Por lo tanto se concluye que el test examinado es específico para los anticuerpos IgG anti-*Helicobacter pylori*.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 171 muestras caracterizadas como positivas y negativas con test endoscópico. 110 sueros resultaban positivos para la presencia de *H. Pylori* en la biopsia gástrica.

DIESSE	REFERENCIA	
	+	-
+	95	2
-	15	59

La sensibilidad y la especificidad resultaron respectivamente 86.4% % y 96.7%.

15. PRECISIÓN

Precisión intra-ensayo ejecutada sobre 3 lotes distintos

Cut Off n=16	Batch. N. 31	Batch. N. 32	Batch. N. 33
O.D.	0.267	0.472	0.494
CV%	10	14	12

Precisión en ensayos

Muestra	AU/ml				
	I run	II run	III run	Media	CV%
PYA1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
PYA2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
PYA3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador

	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

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



INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

ENZY-WELL HELICOBACTER PYLORI IgA

REF 91062

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgA 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 démontré que la rechute, chez les patients souffrant de gastrite, est associée à l'infection par *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 (gastroskopie) pour le prélèvement d'une biopsie.

Il est possible d'observer, chez le patient atteint, une réponse immunologique spécifique. 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. La détermination des IgA est complémentaire à celle des IgG. Puisque la concentration des IgA diminue quelquefois plus rapidement que celle des IgG chez les sujets traités, l'observation de ce paramètre peut être utile. Pour une raison inconnue, 2 % des sérums sont positifs seulement aux IgA.

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-IgA 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.

CONTROL + CONTROLE POSITIF 1 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgA, 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.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE SEUIL 1 x 2 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgA 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.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 16 mL

Composition : Anticorps monoclonaux anti-IgA humaines marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox.

Préparation : Prêt à l'emploi.

IgA CONTROL - CONTROLE NEGATIF IgA 1 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué 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.

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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUANT 50X (PF30267) 1 x 4.5 mL Pour diluer les échantillons de sérum.

Composition : Solution protéique contenant additionnée de 0.05% de phénol et 0.02% de bronidox.

Préparation : Diluer à 1/50 dans la solution tamponnée de lavage pour obtenir une solution de diluant prête à l'emploi.

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.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : H₂SO₄ (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'ouverture et/ou la préparation.

REACTIF	CONDITIONS
MICROPLAQUE	6 semaines à 2/8°C, sachet en polythène.
CONTROLES	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 IgA	1 semaine à 15/30°C, 8 semaines 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 échantillons de serum et les réactifs usages doivent être traités comme 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.
3. En cas de contact d'un réactif avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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 CO₂.
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. ECHANTILLONS ET LEUR 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°C. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20°C. Peut subir jusqu'à un maximum de trois 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).
- Préparation du diluant:
Ajouter le **diluant concentré** à la **solution de lavage** (exemple : 2 ml dans 98 ml d'eau distillée).

Exécution

Diluer les échantillons 1 :101 en versant 10 µl 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.

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 Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque 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 la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits

Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.

10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (≤ 0.150).

Calculer les valeurs du contrôle seuil (analysé en triple). Aucune valeur ne doit s'écarter de plus $\pm 25\%$ de la valeur moyenne, sinon éliminer la valeur aberrante. Recalculer la moyenne.

Le contrôle positif doit avoir une D.O 1.5 fois supérieure à celle du sérum seuil.

Le rapport des D.O du contrôle négatif et du sérum seuil doit être ≤ 0.6 . La D.O. du contrôle seuil doit être ≥ 0.2 à 450 nm et ≥ 0.16 à 450/620 nm.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Index).

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.

12. LIMITES DE LA METHODE

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 IgA 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 IgA anti-Helicobacter pylori.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

Lors d'une expérimentation clinique effectuée dans un laboratoire hospitalier, 171 échantillons ont été analysés, après caractérisation en positif et négatif à travers l'examen endoscopique : 110 sérums étaient positifs en présence de H. Pylori au cours de la biopsie gastrique.

Résultats

DIESSE	REFERENCE	
	+	-
	95	2
	-	
	15	59

La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 86.4% et de 96.7%.

15. PRECISION

Précision dans la série avec 3 lots différents

Seuil n=16	Lot n° 31	Lot n° 32	Lot n° 33
O.D.	0.267	0.472	0.494
CV %	10	14	12

Précision entre séries

Echantillon	AU/ml				
	I run	II run	III run	Moyenne	CV %
PYA1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
PYA2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
PYA3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

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., Seppälä K., Sipponen P., Kasanen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of H. pylori: a morphometric study. Scand. J. Gastroenterology 26: 1057 (1991).
9. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

**ENZY-WELL
HELICOBACTER PYLORI IgA**
REF 91062

(Português)

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Enzywell Helicobacter Pylori IgA é um método de ensaio de imuno-absorção enzimática indicado para a determinação de anticorpos da classe IgA para H. Pylori no soro humano.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Em 1983, Warren e Marshall (1) identificaram o Helicobacter pylori, um novo patógeno bacteriano gram-negativo, em pacientes com gastrite e esta descoberta conduziu a estudos sobre a relação entre infecção bacteriana e doença gástrica crónica (2). Concluiu-se que o patógeno está associado a úlcera péptica, gastrite crónica de tipo B e duodenite. Demonstrou-se que, em pacientes com gastrite, a erradicação da bactéria conduziu à cura da lesão anatómica (4).

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. A determinação dos níveis de anticorpos IgA é complementar à de IgG. Uma vez que os níveis de IgA diminuem mais rapidamente do que o IgG em alguns pacientes em fase de tratamento, este parâmetro pode ser útil no acompanhamento dos pacientes.

Pelo mesmo motivo, um baixo nível de IgA em pacientes com IgG-positivo pode indicar uma infecção curada.

Por razões desconhecidas, cerca de 2% das amostras de soro são positivas apenas para IgA (5,6).

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O teste baseia-se na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática) (5).

O antígeno liga-se à fase sólida. As imunoglobulinas são ligadas ao antígeno 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 IgA anti-humanos monoclonais marcados com peroxidase.

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

A 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 com 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 IgA anti-humanos marcados com Peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol a 0.05% e Bronidox a 0.02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, numa concentração conhecida de anti-H. Pylori IgA, num tampão fosfatado 0.01 mol/L contendo BSA a 1% e azida de sódio a 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

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

IgA CONTROL - CONTROLO NEGATIVO IgA (PF93910) 1 x 1.6 mL

Conteúdo: Soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L, com BSA a 1% e azida de sódio a 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO DIRECTO 1 x 2 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, numa concentração conhecida de anti-H. Pylori IgA, num tampão fosfatado 0.01 mol/L contendo BSA a 1% e azida de sódio a 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

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

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1 x 12 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Pronto a usar. 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).

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

Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij a 0.5%.

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

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUENTE 50X (PF30267) 1 x 4.5 mL Para diluição de amostras de soro.

Conteúdo: Solução proteica adicionado com Fenol a 0.05% e Bronidox a 0.02%.

Preparação: Dilua o volume necessário na proporção de 1:50 com tampão de lavagem para obter o diluente pronto a ser usado.

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

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

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas, comprimento de onda 450 ou 450/620 nm e 450 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 abertura e/ou preparação

REAGENTE	CONDIÇÕES
Microplaca	6 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Controlos	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 IgA	1 semana a 15/30°C, 8 semanas a 2/8°C
Tampão de lavagem	pronto a usar, 2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C.
Solução de paragem	até ao prazo de validade a 2/8°C

6. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES**PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVE A 2-8°C**

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.

Precauções de segurança

2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e o ácido hidrolórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.
6. 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.
7. 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.

Advertências analíticas

5. 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 utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Certifique-se de que o termóstato não desce abaixo de 35°C nem sobe acima de 39°C.**
Abra o saco contendo as tiras pelo menos após 30 minutos à temperatura ambiente.
6. 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**.
7. 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.
8. Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
9. Não exponha os reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
10. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
11. Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
12. Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “sobre” as microplacas.
13. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C num banho de água com um rack ou uma bóia para suportar as placas, se necessário, ou num incubador. Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações, consulte o manual de instruções apropriado. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.
14. 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.
15. A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.
16. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
17. 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 que leve 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).
- Prepare o diluente necessário para as amostras adicionando 1 parte de diluente IgA 50x a 49 partes de tampão de lavagem diluído (exemplo: 2 mL + 98 mL de tampão de lavagem diluído).

Deixe um poço vazio para o branco (apenas o substrato será usado). Coloque calibradores NÃO DILUÍDOS numa tira (100 µL em cada poço). O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 directos e 1 positivo. Dilua as amostras na proporção de 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (recomendam-se testes duplicados).

Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes durante 30 segundos (300 µL), junte 100 µL de conjugado a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais 4 vezes, como descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído (100 µL/poço).

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

A adsorção (O.D.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

- Deixe um poço vazio para o branco (A1)
- K. Coloque 100 µL de controlos (não diluídos) e amostras diluídas (1:101) nos poços da microplaca.
- L. Incube durante 45 minutos a 37°C
- M. Lave 4 vezes (300 µL)
- N. Adicione 100 µL de conjugado (à excepção do poço A1)
- O. Incube durante 45 minutos a 37°C
- P. Lave 4 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 450/620/450 nm dentro de 30 min.

10. VALIDADE DO ENSAIO

A D.O. do branco deve ser ≤ 0.150 .

Subtraia o valor do branco de todas as outras leituras. Os valores O.D. do soro de controlo directo quando forem testados em triplicado devem estar dentro do valor médio de 2.5%. Ignore qualquer valor anormal e volte a calcular a média. O controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1.5 vezes a do directo. A relação entre Controlo Negativo e Directo deve ser ≤ 0.6 . O valor de O.D. do directo deve ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. CÁLCULO QUALITATIVO

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

Calcule a relação entre o valor médio líquido da DO da amostra e a do valor directo (ÍNDICE Directo). A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.2 .

Duvidosa: Se a relação estiver entre 0.8-1.2 ($\pm 20\%$ do valor directo)

Negativa se a relação for < 0.8 .

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

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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 IgA 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 antígenos acima indicados. Pode, assim, concluir-se que o teste é específico para IgA anti-*Helicobacter pylori*.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE RELATIVA

Numa avaliação clínica, 171 amostras foram testadas após caracterização como positivas ou negativas por exame endoscópico: 110 deram positivo quanto à presença de *H. Pylori* na biópsia gástrica.

		REFERÊNCIA	
		+	-
Enzywell	+	95	2
	-	15	59

A sensibilidade e especificidade foram de 86,4% e 96,7%, respectivamente.

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaios efectuada em três lotes diferentes

Valor directo n=16	Lote N.º 31	Lote N.º 32	Lote N.º 33
D.O.	0.267	0.472	0.494
CV%	10	14	12

Precisão entre passagens

amostra	AU/ml				
	I passagem	II passagem	III passagem	Média	CV%
PYA1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
PYA2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
PYA3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

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. BIBLIOGRAFIA

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., Seppälä, 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 Fabbicante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote

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

