

VIROTECH Helicobacter pylori IgA ELISA
(H. pylori IgA ELISA)

N° articolo: EC143A00

VIROTECH Helicobacter pylori IgG ELISA
(H. pylori IgG ELISA)

N° articolo: EC143G00

Codice colore: IgA: blu metallico/nero
IgG: blu metallico

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com



Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test	3
3. Contenuto della confezione	3
1.1 Kit per test IgG	3
1.2 Kit per test IgA	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso	3
5. Precauzioni e avvertenze	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito).....	4
7. Esecuzione del test.....	4
7.1 Materiale di analisi	4
7.2 Preparazione dei reattivi	5
7.3 Esecuzione del test VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Impiego di strumenti ELISA.....	5
8. Valutazione del test.....	6
8.1 Controlli funzionali del test	6
8.2 Calcolo delle unità VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schema di valutazione delle IgG e IgA.....	6
8.4 Limiti del test.....	6
9. Bibliografia	7
10. Schema di svolgimento del test	8

1. Finalità d'uso

Il test ELISA serve per la determinazione qualitativa e semiquantitativa di anticorpi anti-IgG e anti-IgA specifici per *Helicobacter pylori*.

2. Principio del test

ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-IgG e anti-IgA nel siero umano

L'anticorpo ricercato nel siero umano forma un complesso immunitario con l'antigene fissato sulla micropiastra. Le immunoglobuline non legate sono rimosse mediante processi di lavaggio. Il coniugato enzimatico si lega a questo complesso. Il coniugato non legato è rimosso anch'esso a sua volta mediante processi di lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione di substrato (TMB), l'attività enzimatica (perossidasi) causa la comparsa di una colorazione blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante.

Test Immunoblot per la determinazione degli anticorpi anti-IgG e anti-IgA nel siero umano

LINE *Helicobacter pylori* di VIROTECH offre il vantaggio che è possibile evidenziare la formazione di anticorpi contro specifici fattori di virulenza – ad es. proteine CagA e VacA – di *H. pylori*.

3. Contenuto della confezione

1.1 Kit per test IgG

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti singoli in strip rompibili, rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **soluzione PBS per lavaggio (concentrata 20 volte), 50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
4. **controllo IgG negativo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
5. **controllo IgG cut-off, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
6. **controllo IgG positivo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
7. **coniugato IgG (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con stabilizzante proteico e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
8. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 11ml**, pronta per l'uso
9. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

1.2 Kit per test IgA

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti singoli in strip rompibili, rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **soluzione PBS per lavaggio (concentrata 20 volte), 50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
4. **controllo IgA negativo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
5. **controllo IgA cut-off, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
6. **controllo IgA positivo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
7. **coniugato 2 IgA (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con FCS e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
8. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 11ml**, pronta per l'uso
9. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Dopo aver staccato i pozzetti individuali occorrenti, conservare le rimanenti strisce di pozzetti in sacchetto chiuso con essiccante a 2-8°C. Subito dopo l'uso, riporre i reattivi in ambiente a 2-8°C.
2. Il coniugato pronto per l'uso e la soluzione per substrato TMB sono sensibili alla luce e devono essere conservati al riparo dalla luce. Se per l'azione della luce si sviluppa nella soluzione per substrato un'alterazione del colore, la soluzione deve essere eliminata.
3. Prelevare soltanto la quantità di coniugato o di TMB necessaria per il test da eseguire. L'eventuale quantità di coniugato o TMB in eccesso non può essere rimessa nel recipiente originale, ma deve essere eliminata.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	diluiti	da +2 a +8°C	max. 6 ore
	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Micropiastro	dopo l'apertura	da +2 a +8° (conservazione nella busta in dotazione con sacchetto di essiccante)	3 mesi
Assorbente di fattore reumatoide	non diluiti, dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	1 settimana
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Tetrametilbenzidina	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione bloccante	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +25°C	4 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

1. Sono impiegati come sieri di controllo esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per gli anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV e verso l'antigene di superficie dell'epatite B. Tuttavia i campioni, i campioni diluiti, i controlli, i coniugati e le strisce per microtitolazione devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. I componenti che contengono conservanti, come pure la soluzione bloccante al citrato e il TMB, sono irritanti per la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questi materiali, lavare immediatamente la parte interessata sotto acqua corrente e consultare eventualmente un medico.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Acqua distillata/demineralizzata
2. Pipetta a 8 canali 50µl, 100µl
3. Micropipette: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Provette per i campioni
5. Salviette di carta o carta assorbente
6. Pellicola protettiva per piastre ELISA
7. Contenitore per rifiuti infetti
8. Lavatore a mano ELISA o lavatore automatico per micropiastre
9. Spettrofotometro per micropiastre con filtro 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)
10. Incubatore

7. Esecuzione del test

Seguire scrupolosamente il metodo prescritto da VIROTECH Diagnostics è il requisito indispensabile per ottenere i risultati corretti.

7.1 Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

Preparare le diluizioni per i pazienti sempre fresche.

Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente il siero.

1. Utilizzare solo siero fresco e non inattivato.
2. Non impiegare campioni iperlipemici, emolitici e contaminati da batteri, né sieri torbidi (falsi positivi/negativi).

7.2 Preparazione dei reattivi

La VIROTECH Diagnostics System Diagnostica consente una grande flessibilità grazie alla possibilità offerta di impiegare tamponi di diluizione e lavaggio, TMB, soluzione bloccante di citrato e coniugato che soddisfano una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli pronti per l'uso (controlli positivi, controlli cut-off, controlli negativi) sono specifici dei parametri e da impiegare esclusivamente con le piastre indicate dal certificato del controllo qualità.

1. Regolare l'incubatore su 37°C e verificare che questa temperatura sia stata raggiunta prima dell'inizio dell'incubazione.
2. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente; aprire la confezione delle strisce di reazione solo una volta raggiunta questa temperatura.
3. Agitare bene tutti i componenti liquidi prima dell'uso.
4. Diluire la soluzione concentrata per lavaggio con acqua distillata/demineralizzata fino a ottenere 1 litro (in caso di formazione di cristalli del concentrato, portarlo a temperatura ambiente prima della diluizione e agitare bene prima dell'uso).

7.3 Esecuzione del test VIROTECH ELISA

1. Per ogni serie di test dispensare 100µl del tampone diluente pronto per l'uso (valore bianco), dei controlli negativi, cut-off positivi per IgG e IgA dei sieri diluiti dei pazienti. Raccomandiamo sempre una doppia serie (bianco, controlli e sieri pazienti); per i controlli cut-off la doppia serie è obbligatoria. Diluizione operativa dei sieri dei pazienti: 1+100; per es. 10µl di siero + 1ml di tampone diluente.
2. La dispensazione è seguita da un'incubazione per 30 min a 37 °C (con pellicola protettiva).
3. Il periodo d'incubazione viene concluso da 4 lavaggi, ciascuno eseguito con 350-400µl di soluzione di lavaggio per ogni pozzetto. Non lasciare la soluzione di lavaggio nei pozzetti. Gli ultimi residui di liquido devono essere eliminati rovesciando e battendo la piastra su un foglio di carta assorbente.
4. Dispensare 100µl del coniugato pronto per l'uso in tutti i pozzetti.
5. Incubazione del coniugato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva).
6. Terminare l'incubazione del coniugato mediante 4 lavaggi (vedere punto 3).
7. Dispensare in ogni pozzetto 100µl della soluzione per substrato TMB pronta per l'uso.
8. Incubazione della soluzione per substrato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva, tenere al buio).
9. Bloccaggio della reazione del substrato: dispensare 50µl della soluzione bloccante di citrato in ciascun pozzetto. Agitare con cautela e accuratamente la piastra fino alla completa miscelazione dei liquidi e alla comparsa di una colorazione gialla uniforme.
10. Misurare le estinzioni (DO) a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm). Regolare il fotometro in modo da poter sottrarre da tutte le altre estinzioni il valore del bianco misurato. La misurazione fotometrica dovrebbe essere effettuata entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

7.4 Impiego di strumenti ELISA

Tutti i test ELISA VIROTECH Diagnostics possono essere elaborati con strumenti ELISA. L'utilizzatore è tenuto ad eseguire regolari convalide dell'apparecchiatura.

I prodotti ELISA della G.V. sono stati validati sui seguenti analizzatori ELISA (quali Immunozone, Plato 1300GSG, Plato 3300 GSG, e Monet TKA). L'utilizzatore dovrà regolarmente verificare la costante affidabilità del sistema con la seguente procedura:

1. In caso di installazione o di importanti riparazioni del processore ELISA, VIROTECH Diagnostics raccomanda di eseguire la convalida dell'apparecchio secondo le indicazioni del costruttore.
2. Si raccomanda di controllare poi il processore ELISA con il kit di convalida (EC250.00). Questo regolare controllo con il kit di convalida dovrebbe essere eseguito almeno una volta ogni tre mesi.
3. Ogni ciclo di test eseguito deve rispondere ai criteri di idoneità del certificato di controllo qualità allegato al prodotto.

Questa procedura garantisce il perfetto funzionamento del processore ELISA e serve inoltre anche alla garanzia di qualità del laboratorio.

8. Valutazione del test

I controlli pronti per l'uso servono ad una determinazione semiquantitativa di specifici anticorpi IgG e IgA, la cui concentrazione è indicata in unità VIROTECH (= VE). Le variazioni causate dall'esecuzione del test sono compensate dal metodo di calcolo, ottenendo quindi un'elevata riproducibilità. Per il calcolo delle VE si utilizzano i valori DO medi.

8.1 Controlli funzionali del test

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15.

I valori DO dei controlli negativi dovrebbero essere inferiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità, i valori DO dei controlli positivi e dei controlli cut-off dovrebbero essere superiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità.

b) Unità VIROTECH (VE)

Le unità VIROTECH (VE) dei controlli cut-off sono definite pari a 10 VE. Le unità VE calcolate dei controlli positivi devono rientrare nei range indicati dal certificato di controllo qualità.

Se tali requisiti (valori DO, VE) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

8.2 Calcolo delle unità VIROTECH (VE)

L'estinzione del valore bianco (450/620nm) deve essere sottratta da tutte le estinzioni.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{controlli positivi})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{controlli positivi})}}{\text{DO}_{(\text{controlli cut - off})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{siero paziente})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{siero paziente})}}{\text{DO}_{(\text{controlli cut - off})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schema di valutazione delle IgG e IgA

Risultato (VE)	Valutazione
< 9,0	negativo
9,0 - 11,0	zona limite
> 11,0	positivo

- Se le VE misurate del campione sono superiori alla zona limite, i campioni sono considerati positivi. (Fare attenzione alle date delle vaccinazioni!).
- Se le VE misurate si trovano nella zona limite, ma in assenza di concentrazioni significative di anticorpi, i campioni sono considerati al limite. Per accertare con sicurezza la presenza di un'infezione, è necessario determinare il livello di anticorpi di due campioni di siero. Uno dei campioni deve essere testato subito dopo l'inizio dell'infezione, un secondo campione dopo 5-10 giorni (siero convalescente). La concentrazione di anticorpi dei due campioni deve essere determinata in parallelo, cioè nella stessa serie di test. Non è possibile ottenere una diagnosi corretta sulla base della valutazione di un singolo campione.
- Se i valori misurati sono al di sotto della zona limite definita, il campione non contiene anticorpi specifici dell'antigene in misura rilevabile. I campioni sono quindi considerati negativi.
- In presenza di un risultato IgG positivo o IgA positivo, si raccomanda di verificare per conferma con l'ausilio dell'Immunoblots LINE VIROTECH anti Bordetella pertussis.

8.4 Limiti del test

- L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio eventualmente disponibili.
- Nella diagnosi dei pazienti con sospetta infezione da *Helicobacter pylori* devono essere inclusi i risultati del LINE sia per le IgA, sia per le IgG.
- Anche dopo un trattamento efficace, gli anticorpi anti-IgA possono rimanere presenti per un periodo da 6 mesi a 3 anni. Gli anticorpi anti-IgG persistono generalmente molti anni.
- Non si possono escludere attività incrociate con altri patogeni Gram-negativi, ad esempio a causa di omologie di flagelline.

9. Bibliografia

1. *Helicobacter pylori* – Von der Grundlage zur Therapie (1996) Herausgeber P. Malfertheiner, Thieme Verlag
2. Homepage, Nationales Referenzzentrum für *Helicobacter pylori*; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg
3. Zöller et al (1993) Nachweis der *Helicobacter pylori*-Infektion: Rolle der Immundiagnostik. *Klin. Lab.* 39: 45-54
4. Brandis, Eggers (1994) Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, S.495
5. Kist M., Glocker E., *Helicobacter-pylori*-Infektionen: Studie ResiNet zur Resistenzentwicklung - aktuelle Ergebnisse, Epidemiologisches Bulletin, 2005, Nr. 24
6. Kist M., Glocker E., Suerbaum S., Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion, Bundesgesundheitsblatt, 2005
7. *Helicobacter-pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit, AWMF-Leitlinien-Register, Nr. 021/001, 2008

Preparazione dei campioni dei pazienti e soluzione di lavaggio

▼ **Soluzione di lavaggio:** diluire il concentrato con acqua distillata/demineralizzata fino ad ottenere 1 litro

▼ **Campioni di IgG/IgA – diluizione 1:101**

per es.:

10 µl di siero/plasma + 1000 µl di tampone per diluizione
(il tampone per diluizione del siero è pronto per l'uso)

Esecuzione del test

