

VIROTECH Helicobacter pylori IgG LINE Immunoblot

(H. pylori IgG LINE-32)

N.º de encomenda: WE243G32

(H. pylori IgG LINE-96)

N.º de encomenda: WE243G96

VIROTECH Helicobacter pylori IgA LINE Immunoblot

(H. pylori IgA LINE-32)

N.º de encomenda: WE243A32

(H. pylori IgA LINE-96)

N.º de encomenda: WE243A96

EXCLUSIVAMENTE PARA O DIAGNÓSTICO 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**



Índice

1. Utilização	3
2. Princípio do teste	3
3. Conteúdo da embalagem	3
3.1 Kit para 32 determinações	3
3.2 Kit para 96 determinações	3
4. Conservação e prazo de validade do kit e dos reagentes	3
5. Medidas de precaução e avisos	4
6. Material adicionalmente necessário (não fornecido)	4
7. Material de análise	4
8. Realização do teste	4
8.1 Preparação da amostra	4
8.2 Preparação dos reagentes	4
8.3 Execução do teste Immunoblot	6
8.4 Utilização de processadores automáticos	6
9. Avaliação do teste	7
9.1 Utilização do controlo cut off	7
9.2 Significado dos antigénios	7
9.3 Critérios de avaliação	8
8.4 Limites do teste	8
10. Literatura	8
11. Símbolos	8
12. Esquema de realização do teste	9

1. Utilização

Kit de teste LINE destinado à comprovação qualitativa de anticorpos específicos IgG ou IgA contra a *Helicobacter pylori* no soro humano.

2. Princípio do teste

As proteínas do antígeno do agente patogénico são aplicadas a uma membrana de nitrocelulose usando um método de pulverização especial, ao que se segue o corte da membrana de nitrocelulose em tiras individuais.

A incubação das tiras de nitrocelulose que contêm o antígeno com amostras de soro/plasma humano permite comprovar a existência de anticorpos específicos. Estes anticorpos formam imunocomplexos juntamente com os antígenos fixados na tira de teste. Depois de remover os anticorpos não ligados através de vários passos de lavagem, as várias tiras de nitrocelulose são incubadas com anticorpos IgG ou IgA anti-humanos conjugados à fosfatase alcalina. Depois de remover os anticorpos conjugados não ligados através de mais um passo de lavagem, procede-se à visualização dos complexos antígeno/anticorpo (dos anticorpos ligados), através da adição de um substrato incolor que durante a sua transformação enzimática produz bandas azul/violetas ("bandas de antígeno"). A reacção enzima/substrato é parada pela lavagem das tiras de nitrocelulose com água destilada/desionizada. Em função do padrão que se observa na banda, poderá concluir-se a existência ou não de anticorpos IgG ou IgA específicos.

3. Conteúdo da embalagem

3.1 Kit para 32 determinações

- | | | |
|---|-----------|----------|
| 1. Tiras de teste de IgG ou IgA nitrocelulose com antígenos, reforçadas com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar | 1x | 32 tiras |
| 2. Controlo cut off de IgG ou IgA , soro humano, pré-diluído | 1x | 1,0 ml |
| 3. Tampão de diluição/lavagem , pH 7,3 (10x conc.), com tris e conservante | 2x | 50 ml |
| 4. Conjugado IgG ou IgA (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante | 1x | 0.7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar | 1x | 57 ml |
| 6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados | 1x | 1 unid. |

3.2 Kit para 96 determinações

- | | | |
|---|-----------|----------|
| 1. Tiras de teste de IgG ou IgA nitrocelulose com antígenos, reforçadas com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar | 3x | 32 tiras |
| 2. Controlo cut off de IgG ou IgA , soro humano, pré-diluído | 2x | 1,0 ml |
| 3. Tampão de diluição/lavagem , pH 7,3 (10x conc.), com tris e conservante | 4x | 50 ml |
| 4. Conjugado IgG ou IgA (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante | 3x | 0.7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar | 3x | 57 ml |
| 6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados | 3x | 1 unid. |

A pedido pode ser adquirido adicionalmente:

IgG ou IgA- Controlo positivo, soro humano, pré-diluído, 0,5 ml.

As bandas positivas > bandas cut off constam do certificado fornecido.

(N.º de referência: IgG: WE243P60 ou IgA: WE243P40)

IgG/IgA- Controlo negativo, soro humano, pré-diluído, 0,5 ml.

O controlo negativo não mostra bandas, ou seja, bandas relevantes para a avaliação > bandas cut off.

(N.º de referência: IgG/IgA: WE243N20)

4. Conservação e prazo de validade do kit e dos reagentes

Guardar o kit de teste a uma temperatura de 2 – 8 °C. O prazo de validade dos vários componentes é indicado na respectiva etiqueta, o prazo de validade do kit consta no certificado de controlo de qualidade.

1. Não congelar os vários reagentes e não expô-los a temperaturas elevadas.
2. Não usar os reagentes se o prazo de validade estiver ultrapassado.
3. Evitar guardar os reagentes num ambiente de luz forte.
4. A solução de substrato BCIP/NBT é sensível à luz e deve ser guardada num local escuro.
5. **Tiras de teste de nitrocelulose:** Usar as tiras imediatamente depois de as ter tirado do saco. Fechar bem novamente o saco com as tiras não usadas e guardá-lo a uma temperatura de 2 – 8 °C. Para arquivar os resultados, é absolutamente necessário guardar as tiras de teste de nitrocelulose protegidas da incidência directa da luz solar, a fim de evitar o desvanecimento das bandas.

Material	Estado	Armazenamento	Durabilidade
Amostras	Não diluído	+2 a +8°C	1 semana
Tiras de teste	Depois de abrir	+2 a +8°C (armazenamento dentro do saco fornecido)	3 meses

Controlos	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Conjugado	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Diluído	+2 a +8°C	Aprox. 6h
Substrato	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Solução de lavagem	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
	Estado diluído final (pronto a usar)	+2 a +8°C	4 semanas
	Estado diluído final (pronto a usar)	ou temperatura ambiente	2 semanas

5. Medidas de precaução e avisos

1. Como soros de controlo são usados apenas soros que foram testados e que se revelaram negativos em relação aos anticorpos de VIH-1, VIH-2, HCV e ao antígeno de superfície de hepatite B. Mesmo assim, os soros de controlo, as amostras, amostras diluídas, os conjugados e as tiras de teste de microcelulose devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
2. Para a realização do imunoblot devem ser usadas luvas descartáveis e uma pinça de plástico.
3. A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.
4. As tinas de incubação foram concebidas pelo fabricante para o uso único. Uma utilização repetida das tinas de incubação é da responsabilidade do utilizador. Se as tinas de incubação forem usadas várias vezes, recomendamos que depois do seu uso sejam desinfectadas durante várias horas numa solução de hipoclorito de sódio e depois lavadas e passadas exaustivamente por água proveniente da rede de abastecimento e água destilada/desionizada.

6. Material adicionalmente necessário (não fornecido)

1. Tina de incubação (se necessário pode ser adquirida com o n.º de art. WE300.08)
2. Agitador (vertical, não centrifugal)
3. Um frasco de lavagem para parar
4. Pipeta ou dispositivo de lavagem manual
5. Micropipetas 5 µl - 1500 µl
6. Pontas de pipeta
7. Tubos para amostras com 2 – 20 ml de volume
8. Pinça de plástico
9. Água destilada ou desionizada
10. Papel de filtro

7. Material de análise

Como material de análise podem ser usados soro e plasma (o tipo de anticoagulantes não é relevante), mesmo se neste folheto se refere apenas o soro.

8. Realização do teste

O cumprimento exacto das normas de trabalho da Virotech Diagnostics é uma condição essencial para a obtenção de resultados correctos.

8.1 Preparação da amostra

1. Por cada amostra de paciente são necessários 15 µl de soro/ plasma no IgG e 30 µl de soro/ plasma no IgA.
2. As amostras de sangue devem ser colhidas de forma asséptica por punção da veia. Após a coagulação completa deve ser separado o soro (não se aplica ao plasma). Para conservar os soros durante mais tempo, estes devem ser congelados a -20°C.
3. Não voltar a congelar e descongelar os soros.
4. Não devem ser usados soros inactivados pelo calor, lipémicos, hemolizados ou microbianamente contaminados porque podem originar resultados errados.
5. Não usar amostras de soro turvas (sobretudo depois da descongelação), eventualmente centrifugar (5 min. a 1.000x g), pipetar o sobrenadante límpido e usar no teste.

8.2 Preparação dos reagentes

1. Para a adaptação à rotina do laboratório, todos os LINEs e EcoBlots podem ser usados no mesmo teste com os mesmos tempos de incubação e componentes com parâmetros e lotes abrangentes. Os controlos cut off são utilizados especificamente para os parâmetros e lotes.
2. Antes de diluir todos os reagentes do teste, o respectivo concentrado deverá ter atingido temperatura ambiente. Usar apenas água destilada/desionizada de qualidade elevada e à temperatura ambiente.
3. Antes da preparação do teste misturar bem os diluentes.
4. **Tampão de diluição/lavagem**
O tampão de diluição/lavagem existe numa concentração de 10 vezes. Diluir o concentrado de diluição/lavagem 1:10:00 com água destilada ou desionizada (10ml/50ml/100ml de concentrado + 90ml/450ml/900ml de água destilada/desionizada), misturar bem.

Tanto o tampão de diluição/lavagem concentrado como o diluído podem apresentar, eventualmente, uma coloração amarela. Esta coloração amarela não tem influência sobre o prazo de validade do tampão de diluição/lavagem nem sobre a funcionalidade ou capacidade de expressão diagnóstica do teste.

5. **Conjugado de IgG ou IgA**

Diluir o conjugado 1 + 100 com tampão de diluição/lavagem no estado diluído final e misturar bem. Por cada amostra de soro são necessários 1,5 ml de solução de conjugado. Ver tabela de diluição do conjugado (ponto: "Esquema de realização do teste").

6. **Substrato**

O substrato é fornecido pronto a usar.

8.3 Execução do teste Immunoblot

Atenção: As tiras de teste de nitrocelulose podem ser testadas apenas na respectiva classe Ig autorizada (ver etiqueta na caderneta de blot e a designação que consta nas várias tiras de teste).

Para a realização e avaliação correcta do LINE Helicobacter pylori deverá ser realizado em cada teste também um controlo cut off específico para cada parâmetro e cada lote.

1. O teste é realizado a temperatura ambiente.
2. Por cada amostra colocar 1 tira no sulco de uma tina de incubação limpa. Pegar as tiras apenas na ponta marcada superior.
3. Pipetar sempre 1,5 ml de **tampão de diluição/lavagem** pronto a usar e colocar sobre o agitador. Verificar se a tira de teste de nitrocelulose está uniformemente coberta de líquido, pois enquanto se realiza o teste as tiras não podem secar.
4. As tiras de teste de nitrocelulose reforçadas são humedecidas totalmente dentro de um minuto e podem ser incubadas deitadas de costas, de barriga ou de lado.
5. Adicionar com a pipeta **15µl de soro/plasma de paciente no IgG e 30µl de soro/plasma de paciente no IgA;** ou **100µl do controlo cut off / positivo / negativo**, se possível na ponta marcada superior da tira. Incubar as amostras e controlo durante **30 minutos** no agitador. Ao pipetar e durante a seguinte remoção do líquido, estar com atenção para que não haja contaminações cruzadas das várias amostras dos pacientes.
6. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitar o líquido fora com muito cuidado. Ao deitar o líquido fora as tiras de teste de nitrocelulose ficam agarradas ao fundo dos sulcos. Secar o líquido restante com um papel absorvente.
7. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. Antes de proceder ao último passo de lavagem preparar a quantidade necessária de diluente de conjugado fresco (ver tabela).
8. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6).
9. Pipetar sempre 1,5 ml do **diluente de conjugado** obtido para os respectivos sulcos de incubação e incubar durante **30 minutos** no agitador.
10. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora.
11. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. A seguir, lavar durante **1 x 1 minuto** com **água destilada/desionizada**.
12. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6).
13. Pipetar 1,5 ml da **solução de substrato** pronta a usar em cada sulco e revelar durante **10 ± 3 minutos** no agitador.
14. **Parar** a revelação da cor através da remoção do substrato. A seguir, lavar as tiras **3 x** com 1,5 ml de **água destilada/desionizada**, sem incubação intermédia.
15. Deitar a água destilada/desionizada fora e secar as tiras sobre um papel absorvente limpo. A coloração de fundo, observada em tiras de teste de nitrocelulose húmidas, desaparece totalmente quando as tiras estão secas. Em comparação com as tiras de teste de nitrocelulose habituais, as tiras de teste de nitrocelulose reforçadas levam mais tempo a secar.
16. Para a avaliação usar o registo de avaliação e a máscara específica do kit que acompanham a embalagem. A inscrição nas bandas altamente específicas na folha de registo facilita a avaliação das amostras de paciente.

Esquema de teste ver última página

8.4 Utilização de processadores automáticos

Para o processamento automatizado dos Blots e LINES estão validados os seguintes aparelhos: Apollo e Profiblot. Basicamente, são adequados todos os blots automáticos habituais.

9. Avaliação do teste

Para uma avaliação segura, cada tira de LINE proporciona dois controlos:

1. Controlo do soro (= serum control) :

A banda de incubação do soro aparece apenas depois da incubação com soro de paciente, aparecendo por baixo da linha de marcação (= markline).

2. Controlo do conjugado (= conjugate control):

A tira LINE está equipada com uma banda de controlo do conjugado que se torna visível depois da incubação com o respectivo conjugado.

O teste é válido se na tira de teste de nitrocelulose revelada estiver bem visível tanto o controlo de soro como também o controlo de conjugado interno.

A posição das bandas de soro e das bandas de controlo do conjugado consta na folha de registo.

9.1 Utilização do controlo cut off

As bandas cuja intensidade é mais fraca que as bandas cut off do controlo cut off não são utilizadas para a avaliação.

Bandas cut off IgG e IgA: Cag A

9.2 Significado dos antígenos

Antígeno/ Denominação	Peso molecular	Significado dos antígenos	Especificidade dos anticorpos no LINE	Existe no <i>H. pylori</i>
CagA (Citotoxina associada ao gene A)	140 kD	A CagA é introduzida em células hospedeiras, destruindo assim, entre outras, as células gástricas produtoras de ácido, o que, por sua vez, favorece a formação de úlceras gástricas e de carcinomas gástricos. Característico para as estirpes altamente virulentas do Tipo I, inexistente nas estirpes menos virulentas do Tipo II. Altamente imunogénico	Altamente específico	Tipo I
VacA (Citotoxina vacuolizante A)	87 kD	A VacA é induzida no meio que a rodeia, causa danificações celulares na mucosa gástrica e tem um efeito localmente imunossupressivo (12). Característico para as estirpes altamente virulentas do Tipo I, inexistente nas estirpes menos virulentas do Tipo II. Resposta de anticorpos mais irregular em comparação com CagA	Altamente específico	Tipo I
p30	30 kD	Proteína ainda não caracterizada.	Altamente específico	Tipo I e Tipo II
UreA UreaseA Subunidade	26 kD	A urease A não mostra qualquer semelhança às ureases de outros organismos, sendo, assim, um marcador altamente específico para uma infecção por <i>Helicobacter pylori</i> .	Altamente específico	Tipo I e Tipo II
P25	25 kD	Proteína de membrana que favorece a adesão da <i>Helicobacter pylori</i> às células epiteliais gástricas (13).	Altamente específico	Tipo I e Tipo II
p19	19 kD	Proteína de membrana ainda não caracterizada em pormenor	Altamente específico	Tipo I e Tipo II

9.3 Critérios de avaliação

A interpretação dos resultados serológicos deve incluir sempre o quadro clínico, dados epidemiológicos e outros resultados analíticos disponíveis.

Avaliação IgG e IgA recomendada

Banda(s) surgida(s) \geq banda de <i>Cut off</i>	Interpretação
Nenhuma banda ou apenas uma banda de: p30, p19	negativo
Apenas uma banda de: VacA, UreA, p25	evidente
CagA ou Surgimento de ≥ 2 bandas dos seguintes: VacA, p30, UreA, p25, p19	positivo

8.4 Limites do teste

1. Em casos isolados, os soros de paciente podem mostrar bandas “inversas” (fundo escuro, bandas brancas); estas não devem ser consideradas, o que significa que, neste caso, o Immunoblot não pode ser utilizado. O soro deve ser analisado por outros métodos serológicos.
2. A persistência dos anticorpos IgA após um tratamento bem sucedido pode durar entre 6 meses e 3 anos. Os anticorpos IgG persistem, normalmente, durante muitos anos.

10. Literatura

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 (2010)
3. Zöller et al (1993) Nachweis der Helicobacter pylori-Infektion: Rolle der Immundiagnostik. *Klin. Lab.* 39: 45-54
4. Epidemiologisches Bulletin, 2005, Nr. 24
5. Kist M., Glocker E., Suerbaum S., Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion, Bundesgesundheitsblatt, 2005
6. *Helicobacter-pylori* und gastroduodenale Ulkuserkrankheit, AWMF-Leitlinien-Register, Nr. 021/001, 2008
7. Figura N., Helicobacter exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996;10, Suppl. I : 79-96
8. Xiang Z., et al., Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin., *Infect. Immun.* 1995 Jan., 63 (1):94-98
9. Covacci A.S. et al., Molecular characterisation of the 128 kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *PNAS*, 1993, 90:5791
10. Cover T.L. et al., Serologic detection of infection with cagA + Helicobacter pylori strains, *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33 (6), 1496-1500
11. Weel J.F.L., The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin and Helicobacter pylori-related diseases, *JID*, 1996, 173: 1171-5
12. Gebert B. et al., The Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolating to immunosuppressive activities, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152(1): 205-220
13. Moran Anthony P. et al., In vivo expression of the 25-kDa laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43 (2005) 331-337

11. Símbolos



=> Ver instruções de utilização

12. Esquema de realização do teste

Realização do teste numa forma sucinta:

Incubação de amostras	30 minutos	15 µl de soro/plasma de paciente / 100 µl de controlo Sempre em 1,5 ml tampão de diluição/lavagem
Lavar	3 x 5 minutos	Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem
Incubação do conjugado	30 minutos	Com 1,5 ml de conjugado diluído (1 + 100)
Lavar	3 x 5 minutos 1 x 1 minuto	Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem Com água destilada/desionizada
Incubação do substrato	10 ± 3 minutos	Com 1,5 ml de substrato
Parar	3 x sem incubação intermédia	Com 1,5 ml de água destilada/desionizada

Tabela de diluição do conjugado: (arredondado)

Número de tiras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampão de diluição/lavagem	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Concentrado de conjugado	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volume final	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Número de tiras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampão de diluição/lavagem	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Concentrado de conjugado	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volume final	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Número de tiras	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampão de diluição/lavagem	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Concentrado de conjugado	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volume final	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Número de tiras	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampão de diluição/lavagem	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Concentrado de conjugado	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volume final	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml