



ENZYWELL

HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060 (96 tests)

Manufactured by: DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / CONTENU DU COFFRET ET PREPARATOIN DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / MODALITE DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TYPE D'ECHANTLLON
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / MODE OPERATOIRE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DES RESULTATS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITES DE LA METHODE
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / SPECIFICITE ANALYTIQUE
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE
15. PRECISIONE / PRECISION
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING"
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060

(italiano)

1. UTILIZZAZIONE:

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG 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.

3. PRINCIPIO DEL METODO:

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

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

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

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

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

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

- **Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA. 12x8 pozzetti sensibilizzati con Helicobacter pylori.

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

CAL CALIBRATORI. 5 x 1.6 mL.

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

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

Cal 1 5 UA/ml (Calibratore Negativo),

Cal 2 (Cut-off Pediatrico) 10 UA/ml

Cal 3 (Cut-off Adulti) 15 UA/ml

Cal 4 50 UA/ml

Cal 5 100 UA/ml

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO. 1 x 16 mL.

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

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 1 x 100 mL. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 50x DILUENTE 50X (PF93601). 1 x 4.5 mL. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica concentrata 50x, con 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). 12 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 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capaci di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10., 100., 1000 ul di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

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

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

6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

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

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: diluire con molta acqua per la sua eliminazione

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. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a 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 con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. 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. Se non è possibile il prelievo di un campione fresco, i campioni dovrebbero essere chiarificati mediante filtrazione (0,45 µm) o centrifugazione (3000 rpm x 10').

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).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente. Lasciare un pozzetto libero per il bianco (si userà solo per il substrato).

Distribuire 100 µL dei calibratori NON DILUITI nei pozzetti previsti, possibilmente in duplicato, e 100 µL di campione diluito nei rimanenti pozzetti.

Coprire i pozzetti con la pellicola protettiva ed incubare per 45 min. a 37°C. Lavare 4 volte lasciando la soluzione di lavaggio (300 µL) nei pozzetti per 30 secondi per ogni ciclo. Aggiungere 100 µL del coniugato in ciascun pozzetto ed incubare di nuovo per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Lavare di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi distribuire il Substrato (100 µL/pozzetto). Dopo 15 min. a temperatura ambiente bloccare la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Leggere le densità ottiche (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

9. Schema del saggio per Helicobacter pylori IgG

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

10. VALIDAZIONE DEL TEST

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

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

Il Cut-off dei sieri di adulti corrisponde al Calibrator 3.

Il Cut-off dei sieri pediatrici corrisponde al Calibrator 2.

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

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ 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.

Risultati quantitativi

Riportare in grafico le D.O. dei calibratori, sottratte dalla D.O. del bianco, in funzione del titolo di ciascun calibratore.

Ottenere il titolo corrispondente del campione in esame per interpolazione.

NOTA: Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.

Se la D.O. di un campione o calibratore è superiore a 2,0, leggere a 405 nm e moltiplicare il valore per 3.

Il grado di immunità può essere interpretato come segue:

IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-H. pylori nel campione è > 10 UA/mL (per pazienti pediatrici)
 > 15 UA/ml (per pazienti adulti)

NON IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-H. pylori è < 5 UA/mL.

DUBBIO: quando il valore è compreso fra i due valori. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta precoce dell'infezione potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

Sieri fortemente lipemici, emolizzati od inattivati col calore possono dare luogo a risultati falsi e non dovrebbero essere quindi utilizzati.

Come per tutti i tests sierologici, il risultato deve essere comunque valutato insieme ad altri dati clinici e diagnostici.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

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

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

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

Risultati

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	132	6
	-	1	60

Il kit *Helicobacter pylori* presentava 6 falsi negativi ed 1 falso positivo.

La sensibilità e la specificità sono risultate del 95,7% e del 98,4% rispettivamente.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

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

Precisione tra sedute

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

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	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 informazioni tecniche per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Aspirazione inadeguata 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.



ENZYWELL
HELICOBACTER PYLORI IgG

REF 91060

(english)

1. INTENDED USE:

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

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST:

In 1983, Warren and Marshall identified *Helicobacter pylori*, a new gram-negative bacterial pathogen, in patients suffering from gastritis, and this finding led to studies on the relationship between bacterial infection and chronic gastric disease. The pathogen has been shown to be associated with peptic ulcer, chronic gastritis type B and duodenitis. It has been demonstrated that in patients with gastritis, eradication of the bacteria led to healing of the anatomical lesion.

Diagnostic procedures for the detection of the organism generally involve invasive (gastroscopic) techniques for sample collection.

However, a specific immune response is seen in infected patients. The serological test thus represents a useful alternative to the invasive bioptic technique. IgG levels rise with infection and remain constantly high until the infection is eliminated. The efficacy of antimicrobial therapy can therefore be monitored via changes in specific IgG antibody.

3. PRINCIPLE OF THE TEST:

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

The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase.

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

The density of the colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. 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. 12x8 wells coated with *Helicobacter pylori* antigens.

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

CAL CALIBRATORS. 5 x 1.6 mL.

Contents: Diluted human serum at known concentrations of antibodies to *Helicobacter pylori*, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use without further dilution.

The 5 calibrators have the following titers expressed in Arbitrary Units/ml:

Cal 1 5 AU/ml (Negative Calibrator)

Cal 2 (Pediatric Cut-off) 10 AU/ml

Cal 3 (Adult Cut-off) 15 AU/ml

Cal 4 50 AU/ml

Cal 5 100 AU/ml

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

CONJ CONJUGATE. 1x16 mL.

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

WASH BUF WASH BUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 mL. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 50x DILUENT 50X (PF93601). 1x4.5 mL. For dilution of serum samples. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Proteic solution concentrated 50 times, with added 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). 12 mL. Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

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 (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 225-375 µl
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

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

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

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

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; dilute with large amounts of water to eliminate.
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. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
- servicing and maintenance.
-

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at

-20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. 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. If a new sample cannot be obtained, such samples should be clarified by filtration (0.45 µm) or centrifugation (3000 rpm x 10').

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 Diluent 50x to 49 parts of the diluted washing buffer (example: 2 mL + 98 mL of diluted washing buffer).

Dilute the samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Leave one well empty for the blank (only the substrate will be used). Pipet 100 µL of UNDILUTED calibrators in the wells of a strip, preferably in duplicate, and 100 µL of diluted sample in the remaining wells.

Cover the wells with protective film and incubate for 45 minutes at 37°C. After washing four times (300 µL), soaking the wells in the washing solution for 30 seconds for each cycle, add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. Wash the plate again 4 times, as described above. Finally, add the Substrate (100 µL/well).

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

Read the optical densities (O.D.) at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min. Take a new reading at 405 nm if the O.D. are higher than 2000.

9. TEST PROCEDURE FOR HELICOBACTER PYLORI IgG

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

10. TEST VALIDATION

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

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Qualitative results

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

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

Positive: if the ratio is > 1.2 .

Doubtful: $\pm 20\%$ 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.

Quantitative results

Report the OD of the calibrators on a graph after subtracting the OD of the blank. The corresponding titer of the test sample can be obtained by extrapolation.

NOTE: A standard curve must be performed for each run.

If the O.D. of any sample or calibrator is over 2.0, take the reading at 405 nm and multiply the value by 3.

The degree of immunity can be interpreted as follows:

IMMUNE: when the anti-H. Pylori IgG concentration in the sample is > 10 AU/ml (for pediatric patients)
 > 15 AU/ml (for adult patients)

NON IMMUNE: when the anti-H. pylori IgG concentration is < 5 AU/mL

DOUBTFUL : if the result is between the two values. In this case it is advisable to repeat the test in duplicate.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the early acute phase of infection may be negative by this procedure.

Highly lipemic, icteric, hemolysed or heat-inactivated sera may cause false results and should not be used.

As with all serological tests, the results should be interpreted in conjunction with other clinical and diagnostic data.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

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

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

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

The samples were analyzed in Western blot, considered the reference method.

Results

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	132	6
	-	1	60

The Helicobacter pylori kit result 6 false negative and 1 false positive.

The sensitivity and specificity were respectively 95.7% and 98.4%.

15. PRECISION

Within run Precision on three different lots

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

Between run Precision

Sample	AU/ml				Average	CV%
	I run	II run	III run	Average		
PYG1	6.2	7	6.1	6.4	8	

PYG2	24.8	26.1	23.9	24.9	4
PYG3	81.3	88.4	84.8	84.8	4

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

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

17. BIBLIOGRAFIA / 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., 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).



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggini (Siena), Italy.