

**BIOHIT**

Innovating for Health

Biohit Oyj

# **HELICOBACTER PYLORI IgG**



**INSTRUCTIONS FOR USE  
KÄYTTÖOHJE  
ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER  
ARBEITSANLEITUNG  
MANUEL D'INSTRUCTION  
INSTRUCCIONES DE USO  
ISTRUZIONI PER L'USO  
ИНСТРУКЦИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ**

















Biohit Oyj  
Laippatie 1  
FIN-00880 Helsinki, Finland  
Tel: +358-9-773 861  
Fax: +358-9-773 86200  
E-mail: info@biohit.com  
www.biohit.com



601 040.02



**EXPLANATION OF THE SYMBOLS USED IN LABELS**  
**SYMBOLIEN SELITYKSET ETIKETEISSÄ**  
**FÖRKLARING AV SYMBOLERNA SOM ANVÄNDS PÅ ETIKETTERNA**  
**ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN**

	English	Suomi	Svenska	Deutsch
	For <i>in vitro</i> diagnostic use	<i>In vitro</i> diagnostiseen käyttöön	För diagnostisk användning <i>in vitro</i>	Zur <i>In-vitro</i> -Diagnostik
	Catalogue number	Kataloginumero	katalognummer	Katalognummer
	Batch code	Eränumero	Sats kod	Chargennummer
	Use by	Eräntymispäivämäärä	Använd före	Verfallsdatum
	Consult instructions for use	Lue käyttöohjeet	Rådfråga instruktionerna angående användning	Siehe Testanleitung
 +2...+8°C	Storage limitation Store at +2...+8°C	Lämpötilarajoitteet Säilytys +2...+8°C	Temperaturbegränsning. Förvara vid +2...+8 °C	Temperaturangabe Bei +2...+8°C lagern
	96 determinations	96 määrittystä	96 avgörande	96 Bestimmungen
	Do not re-use	Älä käyttää uudelleen	Ingen återvändning	Zum einmaligen Gebrauch
	Washing buffer concentrate (10x)	Pesupuskuri konsentraatti (10x)	Koncentrat för tvättbuffert (10x)	Waschpufferkonzentrat (10x)
	Diluent buffer	Laimennospuskuri	Utspänningsbuffert	Verdünnungspuffer
	Calibrator	Kalibraattori	Kalibrator	Kalibrator
	Negative Control	Negatiivinen kontrolli	Negativ Kontroll	Negativkontrolle
	Positive Control	Positiivinen kontrolli	Positiv Kontroll	Positivkontrolle
	Conjugate solution (100x)	Konjugaattiliuos (100x)	Konjugeringslösning (100x)	Konjugatlösung (100x)
	Substrate solution	Substraattiliuos	Substratlösning	Substratlösung
	Stop solution	Stop-liuos	Stopplösning	Stopplösung

**EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES**  
**EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS USADOS EN ETIQUETAS**  
**SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI IMPIEGATI SULLE ETICHETTE**  
**ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ, ИСПОЛЗУЕМЫХ НА ЭТИКЕТКАХ**

<b>Français</b>	<b>Español</b>	<b>Italiano</b>	<b>Русско</b>
Pour le diagnostic <i>in vitro</i>	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>	Per l'uso diagnostico <i>in vitro</i>	Для диагностики <i>in vitro</i>
Référence catalogue	Número de catálogo	Numero catalogo	Каталожный номер
Code du lot	Código de lote	Codice di lotto	Серийный номер
Date de péremption	Usar antes	Da utilizzarsi per	Использовать до
Consulter les instructions	Consulte instrucciones de uso	Consultare le istruzioni d'uso	Смотрите инструкцию пользователя
Température limite de conservation entre +2...+8°C	Límite de temperatura. Guardar a +2...+8°C	Limiti de temperatura. Conservare a +2...+8°C	Температурные ограничения. Хранить при температуре +2...8 °C
96 déterminations	96 determinaciones	96 determinazioni	96 determinations
Ne pas réutiliser	No reutilizar	Non riutilizzare	Не использовать повторно
Tampón de lavage concentré (10x)	Concentrado de tampón de lavado (10x)	Concentrato di tampone di lavaggio (10x)	Концентрат промывочного буфера (10x)
Tampón de dilution	Tampón diluyente	Tampone di diluizione	Буфер для разведения
Calibreur	Calibrador	Calibratore	Калибратор
Contrôle négatif	Control negativo	Controllo negativo	Отрицательный контроль
Contrôle positif	Control positivo	Controllo positivo	Положительный контроль
Solution de conjugué (100x)	Solución conjugada (100x)	Soluzione coniugata (100x)	Раствор конъюгата (100x)
Solution de substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato	Раствор субстрата
Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione di arresto	Останавливающий раствор

INSTRUCTIONS FOR USE.....	5
KÄYTTÖOHJE.....	19
INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDANDE.....	32
GEBRAUCHSANLEITUNG .....	46
MANUEL D'INSTRUCTION.....	61
INSTRUCCIONES DE USO .....	76
ISTRUZIONI PER L'USO .....	91
ИНСТРУКЦИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ .....	105
REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / QUELLENANGABEN / REFERENCES / REFERENCIAS / RIFERIMENTI / ССЫЛКИ.....	121
ORDERING INFORMATION / TILAUSTIEDOT / BESTÄLLNINGSPERITÄMATION / BESTELLINFORMATION / INFORMATION CONCERNANT LA COMMANDE / INFORMACIÓN DE PEDIDOS / INFORMAZIONI PER LE ORDINAZIONI / ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА.....	122

## INSTRUCTIONS FOR USE

*Helicobacter pylori* IgG ELISA

Cat. No. 601 040.02

## CONTENTS

1. INTENDED USE.....	6
2. SUMMARY AND EXPLANATION.....	6
3. PRINCIPLE OF THE TEST.....	6
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	7
5. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.....	7
6. KIT CONTENTS, REAGENT PREPARATION AND STABILITY OF THE MATERIALS PROVIDED.....	8
6.1. Microplate.....	8
6.2. Washing Buffer Concentrate (10x).....	8
6.3. Diluent Buffer.....	8
6.4. Calibrator.....	8
6.5. Negative Control.....	9
6.6. Positive Control.....	9
6.7. Conjugate Solution.....	9
6.8. Substrate Solution.....	9
6.9. Stop Solution.....	9
6.10. Incubation Covers.....	9
6.11. Instructions for Use.....	9
7. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	10
8. STORAGE AND STABILITY.....	10
9. TEST PROCEDURE.....	11
10. RESULTS.....	12
10.1. Quality Control Values.....	12
10.2. Calculation of the Results.....	13
10.3. Interpretation of the Results.....	13
10.4. Expected Values.....	13
11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	14
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	14
13. DATE OF ISSUE.....	16
14. WARRANTY.....	16
15. SHORT OUTLINE OF THE PROCEDURE.....	18

APPENDIX: QUALITY CONTROL CERTIFICATE

## 1. INTENDED USE

*Helicobacter pylori* IgG ELISA test is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative detection of human IgG class antibodies to *Helicobacter pylori* in EDTA plasma and serum. The test is intended to aid in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult patients with clinical symptoms of gastritis. FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION

*Helicobacter pylori* infection is the most important cause of chronic gastritis. Another mechanism for gastritis and severe atrophic gastritis is the autoimmune mechanism (1, 2). This kit is intended to aid in the diagnosis of *H. pylori* infection.

*Helicobacter pylori* is a spiral shaped, gram-negative bacterium that colonizes in the human stomach. The organism is found in the mucous layer of the stomach overlying the gastric epithelium and it does not appear to invade tissue. However, the mucosa underneath the area of the *H. pylori* colonization is invariably inflamed; this condition is referred to as chronic superficial or non-atrophic gastritis which, if untreated, persists for life (1). This chronic inflammatory process can lead to atrophic gastritis, which has been linked with peptic ulceration and gastric cancer, two important diseases of the upper gastrointestinal tract (3-6). The presence of antibodies to CagA *H. pylori* strains have been linked with the development of atrophic gastritis in corpus (7). The epidemiological evidence indicates a link between gastric adenocarcinoma, mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (8,9) and *H. pylori* infection.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This *H. pylori* IgG antibody ELISA test is based on an enzyme immunoassay technique with partially purified *H. pylori* bacterial antigen adsorbed on a microplate and a detection antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP).

The assay proceeds according to the following reactions:

1. Partially purified *H. pylori* bacterial antigen attached to the polystyrene surface of the wells binds *H. pylori* IgG antibodies present in the sample.

2. Wells are washed to remove residual sample.
3. HRP-conjugated monoclonal anti-human IgG binds to the *H. pylori* IgG antibodies.
4. The wells are washed and the TMB-substrate is added. The substrate is oxidized by the HRP enzyme, resulting in the formation of blue end product.
5. The enzyme reaction is terminated with the stop solution. *H. pylori* positive samples turn yellow with calculated values of >30 EIU.

#### **4. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

**For *in vitro* diagnostic use.**

**CAUTION: Handle plasma and serum samples as potential biohazardous material.**

All samples should be regarded as potentially contaminated and treated as if they were infectious. Please refer to the U. S. department of Health and Human Services (Bethesda, MD., USA) publication Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999, 4th ed. (CDC/NIH) and No. (CDC) 88-8395 or any other local or national regulation on reports of laboratory safety procedures on different diseases.

This kit contains reagents manufactured from human blood components. The source materials provided in this kit have been tested for the presence of antibodies to hepatitis B and C, as well as antibodies to HIV, and found to be negative. However, as no test method can offer absolute assurance that these pathogens are absent, all recommended precautions for the handling of blood derivatives should be observed.

Always use protective gloves when handling patient samples. Use a safety pipetting device for all pipetting. Never pipette by mouth. Read all instructions prior to performing this assay. Dispose of all reagents provided in the kit by pouring into a sink and flushing with an excess of tap water.

#### **5. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Blood sample is collected by venipuncture into e.g. a plastic EDTA or

serum tube. Blood tubes for plasma are mixed immediately by turning them upside down 5-6 times, and tubes for serum are allowed to clot (for minimum 30 minutes) at room temperature (20-25°C). Serum is separated after clotting, and plasma is separated immediately by centrifugation (e.g.) plastic tube, relative centrifugal force up to 2000 G, 10-15 minutes). Plasma/serum can be stored refrigerated (2-8 °C) for three days. For longer storage the samples should be stored frozen (preferably at -70°C, alternatively at -20°C). Mix the samples thoroughly after thawing. Avoid repeated freezing and thawing of the samples. Grossly hemolysed, lipemic or turbid specimen should be avoided.

## **6. KIT CONTENTS, REAGENT PREPARATION AND STABILITY OF THE MATERIALS PROVIDED**

The reagents supplied are sufficient for 96 wells and three separate runs. Reagents of different kit lots should not be mixed.

### **6.1. Microplate**

**Contents:** 12 x 8 strips in frame coated with partially purified *H. pylori* bacterial antigen.

**Preparation:** Ready to use.

**Stability:** Stable until expiry date. Discard the strips after use.

### **6.2. Washing Buffer Concentrate (10x)**

**Contents:** 120 mL of 10 x phosphate buffered saline (PBS) concentrate containing Tween 20 and 0.1% ProClin 300 as preservative.

**Preparation:** Dilute 1 to 10 (e.g. 100 mL + 900 mL) with distilled water and mix well.

**Stability:** The diluted solution is stable for two weeks refrigerated (2-8°C).

### **6.3. Diluent Buffer**

**Contents:** 100 mL of phosphate buffer containing blocking protein, Tween 20, 0.1% ProClin 300 as preservative and red dye extract.

**Preparation:** Ready to use.

**Stability:** Stable until expiry date.

### **6.4. Calibrator**

**Contents:** One vial containing 1.5 mL of human serum-based *H. pylori* IgG calibrator with 0.1% ProClin 300 as preservative. The EIU-value of the calibrator is printed on the label of the vial.

**Preparation:** Ready to use.

**Stability:** Stable until expiry date.

### 6.5. Negative Control

**Contents:** One vial containing 1.5 mL of human serum-based *H. pylori* IgG negative control with 0.1% ProClin 300 as preservative. The EIU-value of the control serum is printed on the label of the vial.

**Preparation:** Ready for use.

**Stability:** Stable until expiry date.

### 6.6. Positive Control

**Contents:** One vial containing 1.5 mL of human serum-based *H. pylori* positive control with 0.1% ProClin 300 as preservative. The EIU-value of the control serum is printed on the label of the vial.

**Preparation:** Ready to use.

**Stability:** Stable until expiry date.

### 6.7. Conjugate Solution

**Contents:** 0.2 mL of HRP-conjugated monoclonal anti-human IgG in stabilizing buffer with 0.02% methylisothiazolone and 0.02% bromonitrodioxane, and 0.002% other active isothiazolones as preservatives.

**Preparation:** Dilute 1 to 100 (e.g. 40  $\mu$ L + 3960  $\mu$ L) with the diluent buffer.

**Stability:** Stable until expiry date. Discard the excess of the diluted conjugate solution after use.

### 6.8. Substrate Solution

**Contents:** 15 mL of tetramethylbenzidine (TMB) in aqueous solution.

**Preparation:** Ready to use.

**Stability:** Stable until expiry date. Avoid exposure to direct light.

### 6.9. Stop Solution

**Contents:** 15 mL of 0.1 mol/L sulfuric acid.

**Preparation:** Ready to use.

**Stability:** Stable until expiry date.

### 6.10. Incubation Covers

Four plastic sheets to cover the microplate during incubation.

### 6.11. Instructions for Use

## 7. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- ▶ Distilled or deionized water
- ▶ Micropipettes and disposable tips, to accurately deliver 5 – 1000  $\mu\text{L}$
- ▶ Pipettes to accurately deliver 1-10 mL
- ▶ 8-channel pipette delivering 100  $\mu\text{L}$
- ▶ Graduated cylinder, 1000 mL
- ▶ Vortex mixer for sample dilutions
- ▶ Test tubes for specimen dilutions
- ▶ Microplate washer
- ▶ Paper towels or absorbent paper
- ▶ Timer
- ▶ Incubator, 37°C
- ▶ Microplate reader, 450 nm
- ▶ e.g. plastic blood collection tube for serum or plasma
- ▶ Container for ice

## 8. STORAGE AND STABILITY

Store the *Helicobacter pylori* IgG kit refrigerated (2-8 °C). When stored at these temperatures, the kit is stable until the expiration date printed on the box label and the label of each individual kit component. Do not freeze or expose the kit to high temperatures, or store above 8°C when not in use. The substrate solution is sensitive to light. The microplate or individual strips should not be removed from the foil pouch until equilibrated to room temperature (20-25 °C). Unused strips must be returned to the foil pouch, sealed and stored at 2-8°C.

Do not use reagents after the expiration date printed on the label. Do not use reagents from kits with different lot numbers or substitute reagents from kits of other manufacturers. Use only distilled or deionized water. The components of the kit are provided at precise concentrations. Further dilution or other alterations of the reagents may cause incorrect results.

### Indication of Kit Deterioration

Liquid components should not be visibly cloudy or contain precipitated material. At 2-8°C, the washing buffer concentrate may, however, partially crystallize, but the crystals will dissolve by mixing at room temperature (20-25°C). The substrate solution should be colorless or pale blue. Any other color indicates deterioration of the substrate solution.

## Storage and stability of the samples

The results of the storage and freeze-thaw study showed that no differences in stability were observed in samples that were *H. pylori* negative, borderline, or clearly *H. pylori* positive. The stability of low positive specimens was not evaluated.

## 9. TEST PROCEDURE

### PRELIMINARY PREPARATIONS

Allow all reagents and the microplate to reach room temperature (20-25°C). Warm the incubator to 37°C. Dilute the washing buffer concentrate 1 to 10 (e.g. 100 mL + 900 mL) with distilled or deionized water. **Read the complete assay procedure before starting. It is recommended that the calibrator, controls and samples are applied to the plate in duplicate wells. It is necessary to use the calibrator and controls in each test run.**

Mix all the reagents well before use.

### STEP 1: SPECIMEN DILUTION

Dilute the mixed plasma or serum samples 1 to 200 (5 µL + 995 µL) with the diluent buffer, **mix well**.

### STEP 2: SAMPLE

Mix and pipette 100 µL of the diluent buffer (Blank), the calibrator (CAL), the negative control (NC), positive control (PC) and diluted samples (S1, S2, S3 etc.) into the wells as duplicates (See Figure 1). Cover the plate with the incubation cover. Incubate for 30 minutes at 37°C. Note: It is recommended that the samples are dispensed into the wells within 10 minutes to avoid assay drift within the plate.

	1	2	3	4	5
A	Blank	Blank			
B	CAL	CAL			
C	NC	NC			
D	PC	PC			
E	S1	S1			
F	S2	S2			
G	S3	S3			
H	etc.	etc.			

Figure 1. Pipetting Order.

### STEP 3: WASHING

Wash the strips with 3 x 350  $\mu\text{L}$  of the diluted washing buffer, and gently tap the inverted plate a few times on a clean paper towel to remove any residual washing buffer.

### STEP 4: CONJUGATE

Pipette 100  $\mu\text{L}$  of the mixed dilution (1 to 100) of conjugate solution into the wells with an 8-channel pipette. Cover the plate with the incubation cover. Incubate for 30 minutes at 37°C.

### STEP 5: WASHING

Wash the strips with 3 x 350  $\mu\text{L}$  of the diluted washing buffer, and gently tap the inverted plate a few times on a clean paper towel to remove any residual washing buffer.

### STEP 6: SUBSTRATE

Pipette 100  $\mu\text{L}$  of the substrate solution into the emptied wells with an 8-channel pipette. Start the incubation timer after pipetting the substrate solution into the first strip and continue the incubation for 30 minutes at room temperature (20-25°C). Avoid direct exposure to light during incubation.

### STEP 7: REACTION STOP

Pipette 100  $\mu\text{L}$  of the stop solution with an 8-channel pipette into the wells.

### STEP 8: MEASURING OF RESULTS

Measure the absorbance at 450 nm within 30 minutes.

## 10. RESULTS

### 10.1. Quality Control Values

1) The calibrator and controls included in the kit should be used in each test run. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the controls or appropriate statistical methods should be used for analyzing control values, which should fall within the appropriate confidence intervals employed in each laboratory. The requirement is that positive control would be positive and negative control negative according to the values established in each laboratory. Expected control results must be obtained in order that the test results will be accepted.

2) Proper functioning of the test can be verified by observing the absorbance value of the calibrator. The absorbance reading of the calibrator should be > 1.000.

## 10.2. Calculation of the Results

Calculate the mean absorbance (A) value for the calibrator, controls and patient samples assayed in duplicate. Subtract the blank value from the calculated mean absorbance values.

Calculate the enzyme immunounits (EIU) as follows:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Sample}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrator}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})} \times 100 = \text{Sample EIU}$$

## 10.3. Interpretation of the Results

Negative < 30 EIU

Positive ≥ 30 EIU

A value less than 30 EIU indicates a negative result, or that no *H. pylori* antibodies have been detected, or that antibodies are below detectable level. A value of 30 EIU or over indicates that *H. pylori* antibodies are detected, and the result is thus positive. For quality purposes, negative and positive controls provided with the kit must be tested in each assay. Expected control results must be obtained in order to accept test results. The magnitude of the measured result above the cut-off value is not indicative of the total amount of antibody present. The cut-off values have been determined using the Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA kit. From patients whose samples yield values near the cut-off, a second sample should be collected, if possible, within a reasonable time period. Each laboratory should establish its own range of expected values for the clinical situation where *H. pylori* IgG antibody values are used for diagnosis. Also the *H. pylori* IgG results determined for a given specimen or with assays from different manufacturers may vary due to differences in assay methods and reagent specificity. Results obtained by other assay methods from other manufacturers should not be used interchangeably.

## 10.4. Expected Values

Most persons exposed to *H. pylori* develop IgG antibodies to the organism (2,5,6). Age-specific rates for the presence of *H. pylori* antibodies are

similar for males and females. The prevalence of *H. pylori* infection is 30-40% in the U.S., Canada, and in Western Europe, about 20% in Australia, and 70-90% in Eastern Europe, Africa, South America and Asia. Many patients who have positive levels of antibody are asymptomatic, even though they are colonized with *H. pylori*. Therefore, antibody levels do not necessarily correlate with the severity of clinical symptoms.

## **11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

As with any diagnostic procedure the Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA results must be interpreted together with the patient's clinical presentation and any other information available to the physician. A positive test for elevated antibodies may be achieved in patients with a recently treated *H. pylori* infection.

## **12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

### **Reproducibility and Imprecision**

#### Inter-assay variation

A panel consisting of ten (10) samples (one negative, seven borderline, one positive and one high positive sample) was used for the determination of inter-assay variation. The samples were measured in duplicates in forty (40) different runs in 20 working days.

For serum samples, the mean coefficient of variation (%CV) ranged from 4.2 to 7.0% and for EDTA samples from 4.2 to 8.1%. The average %CV for borderline serum samples was 6.3% (range 5.4 – 7.0%) and for borderline EDTA samples 6.1% (range 5.0 – 8.1%).

#### Intra-assay variation

A panel consisting of four (4) serum samples (one negative, one borderline, one positive and one high positive) was used for the determination of intra-assay variation. The samples were measured in twenty two (22) single samples in one run and the average from three (3) different runs was calculated.

For serum samples, the mean coefficient of variation (%CV) ranged from 3.8 to 4.6% and for EDTA samples from 3.5 to 4.9%.

## Percent Agreements

The Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA kit was evaluated in three studies with 523, 187 and 134 patient samples from age group of 20 to 89 years.

When compared to culture, the *Helicobacter pylori* IgG ELISA kit exhibited the following performance:

N=523		Culture	
		Positive	Negative
Biohit Diagnostics	Positive	166	9
	Negative	7	341

Clinical Sensitivity	96.5% (95%CI= 92.6 - 98.4%)
Clinical Specificity	96.0% (95%CI= 93.4 - 97.6%)

When compared to histology, the *Helicobacter pylori* IgG ELISA kit exhibited the following performance:

N=187		Histology	
		Positive	Negative
Biohit Diagnostics	Positive	52	8
	Negative	9	118

Percent Positive Agreement	85.2%
Percent Negative Agreement	93.7%

The Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA test was compared to another commercial ELISA for *H. pylori* antibodies and exhibited the following performance:

N=134		Commercial ELISA	
		Positive	Negative
Biohit Diagnostics	Positive	32	1
	Negative	3	98

Percent Positive Agreement	91.4%
Percent Negative Agreement	99.0%

### **Analytical sensitivity**

The sensitivity of the *H. pylori* IgG ELISA was determined according to the NCCLS (CLIA) guideline Consensus Standards for Medical Testing (NCCLS EP17-A).

The limit of blank (LoB) was determined as the 95th percentile under which the measurement results of 60 blank samples (blank solution) fall. The LoB was found to be 1.1 EIU.

The limit of detection (LoD), which is the lowest actual amount of analyte that may be detected with 95% confidence, was assessed using four EDTA plasma and serum samples that contain antibody levels close to the observed LoB value. The LoD was found to be 1.8 EIU for both EDTA plasma and serum samples.

The limit of quantitation (LoQ), i.e. the lowest amount of analyte in a sample that can be reliably detected, was calculated assuming a coefficient of variation (CV%) of 20% at the level of LoD. Accordingly, the LoQ was calculated to be  $1.2 \times \text{LoD} = 2.2$  EIU for both EDTA plasma and serum samples.

## **13. DATE OF ISSUE**

### ***Helicobacter pylori* IgG ELISA kit insert.**

Version 01, 25.06.2009.

## **14. WARRANTY**

The Manufacturer shall remedy all defects discovered in any Product (the "Defective Product") that result from unsuitable materials or negligent workmanship and which prevent the mechanical functioning or intended use of the Products including, but not limited to, the functions specified in the Manufacturer's specifications for the Products. ANY WARRANTY WILL, HOWEVER, BE DEEMED AS VOID IF FAULT IS FOUND TO HAVE BEEN CAUSED BY MALTREATMENT, MISUSE, ACCIDENTAL DAMAGE, INCORRECT STORAGE OR USE OF THE PRODUCTS FOR OPERATIONS OUTSIDE THEIR SPECIFIED LIMITATIONS OR OUTSIDE THEIR SPECIFICATIONS, CONTRARY TO THE INSTRUCTIONS GIVEN IN THE INSTRUCTION MANUAL.

The period of this warranty for the Distributor is defined in the instruction manual of the Products and will commence from the date the relevant Product is shipped by the Manufacturer. In case of interpretation disputes the English text applies.

All Biohit diagnostic kits have been manufactured according to our ISO 9001 / ISO 13485 quality management protocols and have passed all relevant Quality Assurance procedures related to these products.

## 15. SHORT OUTLINE OF THE PROCEDURE

Allow all the reagents to reach room temperature (20-25°C)  
Remember to mix all the reagents and samples well just before pipetting

\*

After mixing, pipette 100 µL of the blank solution, the calibrators, the control and diluted (1 to 200) patient samples into the wells

\*

Incubate for **30 min at 37°C**

\*

Wash the wells 3 times with 350 µL of the diluted washing buffer

\*

Pipette 100 µL of the diluted (1 to 100 dilution) and mixed conjugate solution into the wells

\*

Incubate for **30 min at 37°C**

\*

Wash the wells 3 times with 350 µl of the diluted washing buffer

\*

Pipette 100 µL of the mixed substrate solution into the wells

\*

Incubate for **30 min** at room temperature (**20-25°C**)

\*

Pipette 100 µL of the mixed stop solution into the wells

\*

**Read at 450 nm within 30 minutes**

## KÄYTTÖOHJE

*Helicobacter pylori* IgG ELISA

Kat. Nro. 601040.02

## SISÄLLYS

1. KÄYTTÖTARKOITUS .....	20
2. YHTEENVETO JA SELOSTUS .....	20
3. TESTIN PERIAATET .....	20
4. VAROITUKSET JA TURVATOIMET .....	21
5. NÄYTTEEN KERÄYS JA KÄSITTELY .....	21
6. KITIN SISÄLTÖ, REAGENSSEIEN ESIVALMISTELU JA KITIN SISÄLLÖN STABIILISUUS .....	22
6.1. Mikrotiitterilevy (Microplate) .....	22
6.2. Pesupuskuri konsentraatti (Washing Buffer Conc.) (10x) .....	22
6.3. Laimennospuskuri (Diluent Buffer) .....	22
6.4. Kalibraattori (Calibrator) .....	22
6.5. Negatiivinen kontrolli (Negative Control) .....	23
6.6. Positiivinen kontrolli (Positive Control) .....	23
6.7. Konjugaattiliuos (Conjugate Solution) .....	23
6.8. Substraattiliuos (Substrate Solution) .....	23
6.9. Stopliuos (Stop Solution) .....	23
6.10. Inkubaatiokalvot .....	23
6.11. Käyttöohje .....	23
7. TARVITTAVAT MATERIAALIT, EIVÄT KITIN MUKANA .....	24
8. SÄILYTYS JA SÄILYVYYS .....	24
9. TESTIN MENETELMÄ .....	25
10. TULOKSET .....	26
10.1. Laaduntarkkailu .....	26
10.2. Tulosten laskeminen .....	27
10.3. Tulosten tulkinta .....	27
10.4. Odotettavat tulokset .....	27
11. MENETELMÄN RAJOITUKSET .....	28
12. SUORITUSKYKY .....	28
13. KITIN PÄIVÄYS .....	30
14. TAKUU .....	30
15. TESTIMENETELMÄ LYHYESTI .....	31

LIITE: LAADUNVARMISTUKSEN SERTIFIKAATTI

## 1. KÄYTTÖTARKOITUS

*Helicobacter pylori* IgG ELISA-testi on entsyymaattinen immunologinen määritystesti (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) kvalitatiiviseen ihmisen IgG-luokan *Helicobacter pylori*n vasta-aineiden määrittämiseen EDTA plasmassa ja seerumissa. Testi auttaa diagnosoimaan helikobakteeri-infektiota aikuisilla, joilla on gastriitin kliinisiä oireita. VAIN *IN VITRO* DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN.

## 2. YHTEENVETO JA SELOSTUS

Helikobakteeri-infektio on yksi tärkeimmistä kroonisen gastriitin aiheuttajista. Toinen gastriitin ja jatkuvan atrofisen gastriitin aiheuttaja on n.s. autoimmunimekanismi. (1, 2). Tämä kitti auttaa *helikobakteeri*-infektion diagnosointia.

*Helicobacter pylori* on spiraalin muotoinen, gram-negatiivinen bakteeri, joka elää ihmisen mahalaukussa. Organismia löydetään mahalaukun limakalvolta, joka peittää epiteelikerrosta. Helikobakteerin asuttama mahalaukun limakalvo on aina tulehtunut; tätä tilaa kutsutaan krooniseksi tai non-atrofiseksi gastriitiksi, joka voi kestää koko elinajan (1). Tämä krooninen tulehdustila voi johtaa atrofiseen gastriittiin, joka on yhdistetty peptiseen haavatautiin ja mahalaukun syöpään, kahteen tärkeään ruoansulatuskanavan tautiin (3-6). *CagA H. pylori* -kannan vasta-aineiden kehittyminen on yhdistetty korpuksen atrofisen gastriitin kehittymiseen. (7). Epidemiologinen todistusaineisto on osoittanut yhteyden mahalaukun adenokarsinooman, MALT-lymfooman (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma) (8,9) ja helikobakteeri-infektion välillä.

## 3. TESTIN PERIAATE

Tämä *H. pylori* IgG vasta-aine ELISA-testi perustuu entsyymaattiseen ja immunologiseen menetelmään, jossa osittain puhdistettu *H. pylori* bakteeri-antigeeni on koutattu kuoppalevylle ja detekoidaan HRP-konjugoidulla vasta-aineella.

Määrittäksessä tapahtuvat seuraavat reaktiot:

1. Polystyreenipintaisen mikrotiitterilevyn striippien pinta on päällystetty osittain puhdistetulla *H.pylori* bakteeri-antigeenilla, joka sitoo

- näytteessä olevan *H. pylori* IgG vasta-aineen.
2. Stripeistä pestään ylimääräinen tarttumaton näyte pois.
  3. HRP-konjugoitu monoklonaalinen anti-humaani IgG sitoutuu *H. pylori* IgG vasta-aineeseen.
  4. Stripit pestään ja TMB-substraatti lisätään. Substraatti hapettuu ensyymin vaikutuksesta ja nähdään sinisenä lopputuotteena.
  5. Entsyymireaktio lopetetaan Stop-liuoksella. Positiiviset *H. pylori*  $\geq 30$  EIU näytteet muuttuvat keltaisiksi.

#### 4. VAROITUKSET JA TURVATOIMET

Vain *in vitro* diagnostiseen käyttöön.

**VAROITUS:** Käsittele plasma- ja seeruminäytteitä mahdollisina tartuntavaarallisina näytteinä.

Kaikkiin näytteisiin tulee suhtautua niinkuin ne olisivat mahdollisesti tartuntavaarallisia näytteitä. Seuraa U. S. department of Health and Human Services (Bethesda, MD., USA) julkaisua "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1999, 4th ed. (CDC/NIH) ja No. (CDC) 88-8395 tai muuta paikallisen tai kansallisen säädöksen julkaisua näytteiden käsittelyn ja laboratorion turvallisuuden suhteen.

Tämän kitin reagensseissa on käytetty ihmisen veren komponentteja. Kitin materiaalit on testattu hepatiitti B:n ja C:n sekä HIV vasta-aineiden varalta ja todettu negatiivisiksi. Mikään testi ei kuitenkaan paljasta kaikkia taudinaiheuttajia, joten näytteiden käsittelyssä on oltava huolellinen.

Käsitellessäsi potilasnäytteitä on ehdottomasti käytettävä suojakäsineitä. Käytä käyttäjälle turvallisia pipettejä kaikkiin pipetointeihin. Älä koskaan pipetoi suulla. Lue käyttöohjeet ennen määrityksen aloittamista. Hävitä kitin mukana tulleet reagenssit kaatamalla ne viemäriin ja huuhtelemalla juoksevalla vedellä.

#### 5. NÄYTTEEN KERÄYS JA KÄSITTELY

Laskimoverinäyte kerätään esim. muoviseen EDTA- tai seerumiputkeen. Plasmaputket sekoitetaan heti kääntämällä ylösalaisin 5-6 kertaa, ja

seerumiputkien annetaan hyytyä (vähintään 30 minuuttia) huoneenlämmössä (20-25°C). Plasma erotetaan heti ja seerumi hyytymisen jälkeen sentrifugoimalla 2000G, 10-15 min. Plasma/seerumi voidaan säilyttää jääkaapissa (2-8 °C) kolmen päivän ajan. Pidempiaikaisen säilytyksen tulee tapahtua pakkasessa (mieluiten -70°C, vaihtoehtoisesti -20°C). Sulatuksen jälkeen näyte sekoitetaan huolellisesti. Näytteen toistuvaa sulattamista/jäädyyttämistä ei suositella. Voimakkaasti hemolysoituneen, lipeemisen tai samean näytteen käyttöä on vältettävä.

## **6. KITIN SISÄLTÖ, REAGENSSEIEN VALMISTUS JA KITIN SISÄLLÖN STABIILISUUS**

Mukana tulevat reagenssit riittävät 96 kuoppaan ja kolmeen eri määrittyskertaan. Eri kittilottien reagensseja ei saa sekoittaa.

### **6.1. Mikrotiiterilevy (Microplate)**

**Sisältö:** x 8 striippiä, käsitelty osittain eristetyllä *H. pylori* bakteeriantigeenilla.

**Valmistus:** Käyttövalmis.

**Säilyvyys:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti. Hävitä käytetyt stripit.

### **6.2. Pesupuskuri konsentraatti (Washing Buffer Concentrate) (10x)**

**Sisältö:** 120 mL of 10 x fosfaattipuskuri (PBS) konsentraatti sisältäen Tween 20 ja 0.1% ProClin 300 säilöntäaineena.

**Valmistus:** Laimenna 1:10 (esim. 100 mL + 900 mL) tislattuun veteen ja sekoita hyvin.

**Säilyvyys:** Laimennettu liuos säilyy muutaman viikon jääkaapissa (2-8°C).

### **6.3. Laimennospuskuri (Diluent Buffer)**

**Sisältö:** 100 mL fosfaattipuskuria, sisältäen estävää proteiinia, Tween 20, 0.1% ProClin 300 säilöntäaineena ja punaista väriainetta.

**Valmistus:** Käyttövalmis.

**Säilyvyys:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti.

### **6.4. Kalibraattori (Calibrator)**

**Sisältö:** Yksi annos sisältää 1.5 mL seerumipohjaista *H. pylori* IgG kalibraattoria, joka sisältää 0.1% ProClin 300 säilöntäaineena. Kalibraattorin EIU määrä on mainittu pullon etiketissä.

**Valmistus:** Käyttövalmis.

**Säilyvyys:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti.

### 6.5. Negatiivinen kontrolli (Negative Control)

**Sisältö:** Yksi annos sisältää 1.5 mL seerumipohjaista *H. pylori* negatiivista kontrollia, joka sisältää 0.1% ProClin 300 säilöntäaineena. Kontrollin EIU määrä on mainittu pullon etiketissä.

**Valmistus:** Käyttövalmis.

**Stability:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti.

### 6.6. Positiivinen kontrolli (Positive Control)

**Sisältö:** Yksi annos sisältää 1.5 mL seerumipohjaista *H. pylori* positiivista kontrollia, joka sisältää 0.1% ProClin 300 säilöntäaineena. Kontrollin EIU määrä on mainittu pullon etiketissä.

**Valmistus:** Käyttövalmis.

**Säilyvyys:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti.

### 6.7. Konjugaattiliuos (Conjugate Solution)

**Sisältö:** 0.2 mL HRP-konjugoitua monoklonaalista anti-humaani IgG stabilointipuskurissa, jossa säilöntäaineena on 0.02% metyyli-isotiatsolonia ja 0.02% bromonitrodioksaania sekä 0.002% muita aktiivisia isotiatsoloneja.

**Valmistus:** Laimenna 1:100 (esim. 40 µL + 3960 µL) laimennospuskuriin.

**Säilyvyys:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti. Hävitä ylijäänyt laimennettu liuos käytön jälkeen.

### 6.8. Substraattiliuos (Substrate Solution)

**Sisältö:** 15 mL tetrametyylibentsidiiniä (TMB) vesiliuoksena.

**Valmistus:** Käyttövalmis.

**Säilyvyys:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti. Vältä suoraa altistumista valolle.

### 6.9. Stopliuos (Stop Solution)

**Sisältö:** 15 mL 0.1 mol/L rikkihappoa.

**Valmistus:** Käyttövalmis.

**Säilyvyys:** Säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti.

### 6.10. Inkubaatiokalvot

Neljä muovista inkubaatiokalvoa kuoppalevyn peittämiseen inkubaatioiden aikana.

### 6.11. Käyttöohje

## 7. TARVITTAVAT MATERIAALIT, EIVÄT KITIN MUKANA

- Tislattua tai deionisoitua vettä
- Mikropipettejä ja kertakäyttökärkiä (5 – 1000 µL)
- Pipettejä (1-10 mL)
- 8-kanavainen pipetti 100 µL
- Mittalasi 1000 mL
- Koeputkisekoitin näytteen laimentamiseen
- Koeputkia näytteiden laimentamiseen
- Mikrotiiterilevyjen pesuri
- Paperipyyhkeitä
- Kello
- Inkubaattori, 37°C
- Mikrotiiterilevyjen lukija, 450 nm
- Esim. muovisia plasma- tai seerumiputkia
- Jäähaude

## 8. SÄILYTYS JA SÄILYVYYS

Säilytä *Helicobacter pylori* IgG kitti jääkaapissa (2-8 °C). Säilytettäessä jääkaapissa kitin komponentit säilyvät pakkauksen etiketissä mainittuun päivään asti. Älä jäädytä tai säilytä kittiä korkeassa lämpötilassa. Substraattiliuos on valolle herkkä. Kuoppalevyä tai yksittäisiä strippejä ei pidä ottaa foliopussista pois ennenkuin sen lämpötila on tasaantunut huoneenlämpötilaan (20-25 °C). Käyttämättömät stripit laitetaan takaisin foliopussiin, suljetaan huolellisesti ja säilytetään jääkaapissa 2-8°C.

Älä käytä reagensseja etiketteihin merkityn säilyvyysajan jälkeen. Älä käytä reagensseja eri kiteistä joissa on eri eränumero (lot), äläkä käytä muiden valmistajien reagensseja. Käytä vain tislattua tai deionisoitua vettä. Kitin komponenteissa on mainittu tarkat konsentraatiot. Jatkolaimenokset tai muut muutokset voivat aiheuttaa vääriä tuloksia.

### Kitin pilaantumisen ilmeneminen

Liuosmaiset komponentit eivät saa olla näkyvästi sameita eikä niissä saa näkyä saostumia. Pesupuskuri saattaa kuitenkin osittain kiteytyä 2-8°C:ssa, mutta kiteet liukenevat huoneenlämmössä (20-25°C). Substraattiliuoksen tulisi olla väritön tai hennon sinertävä. Mikä tahansa muu väri substraattiliuoksessa ilmaisee sen pilaantuneen.

## Näytteen säilytys ja säilyminen

Näytteiden säilyvyys ja sulatus-jäädytys tutkimukset osoittivat, että säilyvydessä ei havaittu eroavaisuuksia kun kysymyksessä oli *H. pylori* negatiivinen näyte tai selvästi positiivinen näyte. Heikkoa positiivista näytettä ei tutkimuksessa ollut mukana.

## 9. TESTIMENETELMÄ

### ETUKÄTEISVALMISTELUT

Anna kaikkien reagenssien ja mikrotiiterilevyn tasaantua huoneenlämpöön. Esilämmitä inkubaattori 37°C:een. Laimenna pesupuskurikoncentraatti 1:10 (esim. 100 mL + 900 mL) tislattuun tai deionisoituun veteen. **Lue koko käyttöohje ennen määrittämisen aloittamista. On suositeltavaa, että kalibraattori, kontrollit ja näytteet pipetoidaan levyille kaksoismäärittäjinä. On tärkeää käyttää kalibraattoria ja kontrolleja mukana jokaisessa määrittämisessä.**

Sekoita kaikki reagenssit huolellisesti ennen käyttöä.

### VAIHE 1: NÄYTTEEN LAIMENNOS

Laimenna sekoitettu plasma- tai seeruminäyte 1:200 (5 µL + 995 µL) laimennospuskuriin, **sekoita hyvin.**

### VAIHE 2: NÄYTTEIDEN PIPETOINTI

Sekoita ja pipetoi 100 µL laimennospuskuria (Blank), kalibraattoria (CAL), negatiivista kontrollia (NC), positiivista kontrollia (PC) ja laimennettuja näytteitä (S1, S2, S3 jne.) mikrotiiterilevyn kuoppiin kaksoiskappaleena (Katso kuva 1). Peitä levy inkubaatiokalvolla. Inkuboi 30 minuuttia 37°C:ssa. Huom. On suositeltavaa, että näytteet saadaan pipetoitua levyille 10 minuutin sisällä, jotta vältetään ryömintävaikutukselta.

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	Blank	Blank			
<b>B</b>	CAL	CAL			
<b>C</b>	NC	NC			
<b>D</b>	PC	PC			
<b>E</b>	S1	S1			
<b>F</b>	S2	S2			
<b>G</b>	S3	S3			
<b>H</b>	etc.	etc.			

Kuva 1. Pipetointijärjestys.

### VAIHE 3: PESU

Pese kuoppalevy 3 x 350 µL laimennetulla pesuliuksella ja taputa kevyesti ylösalaisin käännettyä levyä muutaman kerran puhtaan paperipyyhkeen päälle, jotta kuopissa oleva ylimääräinen neste imeytyy pois.

### VAIHE 4: KONJUGAATTI

Pipetoi 100 µL laimennettua ja sekoitettua (1 suhde 100) konjugaattiliuosta kuoppiin 8-kanavaisella pipetillä. Peitä levy inkubaatiokalvolla. Inkuboi 30 minuuttia 37°C:ssa. at 37°C.

### VAIHE 5: PESU

Pese kuoppalevy 3 x 350 µL laimennetulla pesuliuksella ja taputa kevyesti ylösalaisin käännettyä levyä muutaman kerran puhtaan paperipyyhkeen päälle, jotta kuopissa oleva ylimääräinen neste imeytyy pois.

### VAIHE 6: SUBSTRAATTI

Pipetoi 100 µL substraattiliuosta tyhjiin kuoppiin 8-kanavaisella pipetillä. Aloita inkubaatioajan laskeminen heti kun olet pipetoinut ensimmäisen stripin ja jatka inkubointia 30minuuttiin asti huoneenlämmössä (20-25°C). Vältä suoraa valoa inkubaation aikana.

### VAIHE 7: REAKTION PYSÄYTTÄMINEN

Pipetoi kuoppiin 100 µL Stop-liuosta 8-kanavaisella pipetillä.

### VAIHE 8: TULOSTEN MITTAUS

Mittaa absorbanssi 450 nm aallonpituudella 30 minuutin kuluessa.

## 10. TULOKSET

### 10.1. Laaduntarkkailu

1) Kalibraattoria ja kontrolleja, jotka tulevat kitin mukana, tulee käyttää jokaisessa määrittäksessä. Jokaisen laboratorion tulisi graafisesti seurata kontrollien arvoa testeissä tai käyttää sopivaa statistista menetelmää jolla analysoida kontrollien arvoja. Vaatimuksena on, että positiivinen kontrolli on positiivinen ja negatiivinen kontrolli negatiivinen sen mukaan miten arvot on määritetty kussakin laboratorioissa. Kontrollien arvot on saavutettava, jotta näytteiden tulokset voidaan hyväksyä.

2) Testin toimintaa voidaan todentaa tarkastelemalla kalibraattorin absorbanssiarvoa. Sen tulee olla  $> 1.000$ .

## 10.2. Tulosten laskeminen

Laske absorbanssien keskiarvo ( $A$ ) kalibraattorille, kontrolleille ja potilasnäytteille, jotka määritetty kaksoiskappalein. Vähennä nollausliuoksen (blank) keskiarvo muista arvoista.

Laske entsyymi-immunoyksiköt (EIU) seuraavasti:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Näyte}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrator}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})} \times 100 = \text{Näyte EIU}$$

## 10.3. Tulosten tulkinta

Negatiivinen  $< 30$  EIU

Positiivinen  $\geq 30$  EIU

Pienempi arvo kuin 30 EIU osoittaa negatiivisen tuloksen, tai että *H. pylori* vasta-ainetta ei ole mitattu tai vasta-aineen taso on alle mitattavan tason. Arvo 30 EIU tai yli osoittaa, että *H. pylori* vasta-ainetta on löytynyt ja näin ollen tulos on positiivinen. Laadun takaamiseksi negatiivinen ja positiivinen kontrolli, jotka tulevat kitin mukana, on testattava jokaisessa määrittämisessä. Odotettava kontrollin tulos täytyy saavuttaa, jotta tulokset voidaan hyväksyä. Määritettyjen tulosten suuruus cut-off alueen yläpuolella ei anna suuntaa vasta-aineen kokonaismäärästä. Cut-off arvot on määritetty käyttämällä Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA kittiä. Potilailta, joiden näytteiden tulos on lähellä cut-off aluetta, tulisi ottaa uusintanäyte kohtuullisen ajan kuluessa. Jokaisen laboratorion tulisi määrittää omat *H. pylori* IgG vasta-aineen referenssirajansa kun tuloksia käytetään diagnoosin tekemiseen. On myös huomattava, että *H. pylori* IgG tulokset samasta näytteestä tehtynä eri valmistajien kiteillä eroavat toisistaan, johtuen eri määrittämenetelmistä ja reagenssien erilaisesta spesifisyydestä. Muiden valmistajien testituloksia ei voi käyttää suoraan vertailuun.

## 10.4. Odotettavat tulokset

Useimmat helicobakteeritartunnan saaneet ihmiset muodostavat IgG-luokan vasta-aineita kyseiselle organismille (2,5,6). Ikäspesifiset *H. pylori* prevalenssit ovat samanlaisia naisilla ja miehillä. *H. pylori* infektion levinneisyys

on 30-40% Yhdysvalloissa, Canadassa, ja Länsi- Euroopassa, noin 20% Australiassa, ja 70-90% Itä-Euroopassa, Afrikassa, Etelä-Amerikassa ja Aasiassa. Monilla potilailla, joilla on korkea vasta-aine pitoisuus, ei välttämättä ole kliinisiä oireita vaikka *H.Pylori* olisi todettakin. Siksi vasta-ainetasot eivät välttämättä korreloi kliinisiin oireisiin.

## 11. MENETELMÄN RAJOITUKSET

Kuten muissakin diagnostisissa menetelmissä, lääkärin täytyy tulkita Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA tulokset yhdessä potilaan kliinisen kuvan tai muun tiedon kanssa. Henkilöillä, joille on vastikään tehty *helikobakteerin* häätöhoito, voi yhä olla huomattava vasta-ainepitoisuus.

## 12. SUORITUSKYKY

### Toistettavuus ja epätarkkuus

Eri analyysikertojen välinen vaihtelevuus

Määritettäessä eri analyysikertojen välistä vaihtelevuutta käytettiin kymmentä (10) näytettä; (yksi negatiivinen, seitsemän lähellä cut-off aluetta olevaa näytettä, yksi positiivinen ja yksi korkea positiivinen). Näytteet määritettiin kaksoismäärityksenä neljässäkymmenessä (40) eri ajossa 20 työpäivän aikana.

Seeruminäytteet: %CV (the mean coefficient of variation) oli 4.2 ja 7.0% välillä. EDTA plasmanäytteet: %CV vaihteluväli oli 4.2 - 8.1%. Keskiarvo CV% cut-off lähialueen seeruminäytteille oli 6.3% (alue 5.4 – 7.0%) ja EDTA plasmanäytteille 6.1% (alue 5.0 – 8.1%).

Analyysin sisäinen vaihtelevuus

Määritettäessä analyysin sisäistä vaihtelevuutta, käytettiin neljää (4) seeruminäytettä (yksi negatiivinen, yksi cut-off lähialueen näyte, yksi positiivinen ja yksi korkea positiivinen) Näytteet määritettiin 22 yksittäismäärityksenä yhden ajon aikana ja kolmen erillisen ajon perusteella laskettiin näytteiden keskiarvot.

Seeruminäytteiden %CV vaihteli 3.8-4.6% välillä ja EDTA-plasman 3.5-4.9% välillä.

## TESTIMENETELMÄN TOIMIVUUS

Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA kitti on evaluoitu kolmessa eri tutkimuksessa, joissa potilaita oli 523, 187 ja 134, iältään 20-89 vuotiaita.

Vertailtaessa viljelytulokseen, *Helicobacter pylori* IgG ELISA kitin suorituskyky oli seuraava:

N=523		Viljely	
		Positiivinen	Negatiivinen
Biohit Diagnostics	Positiivinen	166	9
	Negatiivinen	7	341

Kliininen herkkyys	96.5% (95%CI= 92.6 - 98.4%)
Kliininen spesifisyys	96.0% (95%CI= 93.4 - 97.6%)

Vertailtaessa histologian tuloksiin, *Helicobacter pylori* IgG ELISA kitin suorituskyky oli seuraava:

N=187		Histologia	
		Positiivinen	Negatiivinen
Biohit Diagnostics	Positiivinen	52	8
	Negatiivinen	9	118

Positiivisia näytteitä oikein	85.2%
Negatiivisia näytteitä oikein	93.7%

Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA testiä verrattiin toiseen kaupalliseen ELISA *H. pylori* vasta-aine testiin, ja se saavutti seuraavat tulokset:

N=134		Commercial ELISA	
		Positiivinen	Negatiivinen
Biohit Diagnostics	Positiivinen	32	1
	Negatiivinen	3	98

Positiivisia näytteitä oikein	91.4%
Negatiivisia näytteitä oikein	99.0%

## **Analyttinen herkkyys**

*H. pylori* IgG ELISA testin herkkyys määritettiin NCCLS (CLIA) Consensus Standards for Medical Testing (NCCLS EP17-A) mukaisesti.

LoB (the limit of blank) määritettiin 95 persenttiinä 60 laimennuspuskurilla saaduista tuloksista (blank solution). LoB oli 1.1 EIU.

LoD (the limit of detection) oli matalin analyytin määrä, joka voitiin määrittää 95% luotettavuudella. Se tehtiin neljällä EDTA plasmalla ja seerumilla, joissa vasta-ainetasot olivat lähellä havaittua LoB arvoa. LoD arvo oli 1.8 EIU sekä EDTA plasmalle että seeruminäytteille.

LoQ (the limit of quantitation) tarkoittaa sitä matalinta määrää, joka voidaan varmasti mitata. LoQ laskettiin käyttäen oletusarvona 20 % CV LoD tasolla. Silloin laskettu LoQ arvo oli  $1.2 \times \text{LoD} = 2.2$  EIU sekä EDTA plasmalle että seeruminäytteille.

## **13. KITIN PÄIVÄYS**

*Helicobacter pylori* IgG ELISA käyttöohje.

Version 01, 25.06.2009.

## **14. TAKUU**

Valmistaja lupaa korvata kaikki sen tuotteissa löydetyt viat ("Viallinen tuote") jotka johtuvat epäsovivista materiaaleista tai huolimattomasta valmistustyöstä, mikä estää tuotteen mekaanisen toiminnan tai tarkoitetun käytön mukaanlukien, muttei rajoitettuna vain, toiminnot jotka on lueteltu valmistajan antamassa tuoteselostuksessa. TAKUU TULLAAN SILTI PITÄMÄÄN MITÄTÖITYNÄ JOS VIAN HUOMATAAN AIHEUTUNEEN TUOTTEEN VAHINGOITTAMISESTA, VÄÄRINKÄYTÖSTÄ, VÄÄRÄSTÄ SÄILYTYKSESTÄ, TAI KÄYTÖSTÄ ANNETTUIEN SPESIFIKAATIOIDEN TAI RAJOITUSTEN ULKOPUOLELLA. TAI KÄYTTÖOHJEEN VASTAISESTI.

Takuun voimassaoloaika määritellään tuotteiden käyttöohjeissa ja alkaa siitä päivästä jona kyseessä oleva tuote on lähetetty asiakkaalle valmistajalta. Tulkinnasta johtuvien epäselvyyksien kyseenollessa englanninkielinen versio on voimassa. Kaikki Biohitin kitit on valmistettu yhtiön ISO 9001/ ISO 13485 laaduntarkkailukäytännön mukaisesti ja ovat läpäisseet asiaankuuluvat, kyseessä oleville tuotteille laaditut laaduntarkkailuprosessit.

## 15. TESTIMENETELMÄ LYHYESTI

Saata kaikki reagenssit huoneenlämpöön (20-25°C)  
Muista sekoittaa kaikki reagenssit ja näytteet hyvin juuri ennen pipetoimista

\*

Sekoituksen jälkeen pipetoi 100 µL laimennusliuosta (blank), kalibraattoria, kontrolleja ja laimennettua (1:100) potilasnäytettä mikrotiiterilevyn kuoppiin

\*

**Inkuboi 30 min 37°C:ssa**

\*

Pese kuopat 3 kertaa 350 µL laimennetulla pesuliuksella

\*

Pipetoi 100 µL laimennettua (1:100 laimennos) ja sekoitettua konjugaattia kuoppiin

\*

**Inkuboi 30 min 37°C:ssa**

\*

Pese kuopat 3 kertaa 350 µL laimennetulla pesuliuksella

\*

Pipetoi 100 µL sekoitettua substraattiliuosta kuoppiin

\*

**Inkuboi 30 min huoneenlämmössä (20-25°C)**

\*

Pipetoi 100 µL sekoitettua stop-liuosta kuoppiin

\*

**Mittaa 450 nm 30 minuutin kuluessa**

## INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDANDE

*Helicobacter pylori* IgG ELISA

Kat. Nr. 601 040.02

## INNEHÅLL

1. AVSEDD ANVÄNDNING .....	33
2. SAMMANDRAG OCH FÖRKLARING .....	33
3. PRINCIPEN FÖR TESTET.....	33
4. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER .....	34
5. INSAMLING OCH HANTERING AV PROV .....	34
6. KITTETS INNEHÅLL, PREPARERING AV REAGENSER SAMT STABILITET FÖR DE LEVERERADE MATERIALEN .....	35
6.1. Microplatta (Microplate).....	35
6.2. Koncentrat för tvättbuffert (Washing Buffer Concentrate)(10x)	35
6.3. Utspädningsbuffert (Diluent Buffer).....	35
6.4. Kalibrator (Calibrator).....	35
6.5. Negativ Kontroll (Negative Control).....	36
6.6. Positiv Kontroll (Positive Control).....	36
6.7. Konjugeringslösning (Conjugate Solution).....	36
6.8. Substratlösning (Substrate Solution).....	36
6.9. Stopplösning (Stop Solution).....	36
6.10. Inkubationstäckning .....	37
6.11. Användningsinstruktioner .....	37
7. MATERIAL SOM ERFODRAS MEN EJ INGÅR .....	37
8. FÖRVARING OCH STABILITET .....	37
9. TESTETS TILLVÄGAGÅNGSSÄTT .....	38
10. RESULTAT.....	40
10.1. Värden för Kvalitetskontroll .....	40
10.2. Beräkning av Resultaten .....	40
10.3. Tolkning av Resultaten .....	40
10.4. Förväntade Värden .....	41
11. FÖRFARINGSSÄTTETS BEGRÄNSNINGAR.....	41
12. UTFÖRANDETS KÄNNETECKEN.....	41
13. UTGIVNINGSDATUM.....	43
14. GARANTI.....	44
15. EN KORT ÖVERSIKT AV PROCEDUREN.....	45

BILAGA: CERTIFIKAT ÖVER KVALITETSKONTROLL

## 1. AVSEDD ANVÄNDNING

*Helicobacter pylori* IgG ELISA testet är en enzym-länkad immunosorbent analys (ELISA) för kvalitativt finande av mänskliga klass IgG klass antikroppar mot *Helicobacter pylori* i EDTA plasma och serum. Testet är avsett att assistera i diagnosen av *Helicobacter pylori* infektioner hos vuxna patienter med kliniska indikationer av magkatarr. FÖR DIAGNOSTISK ANVÄNDNING IN VITRO.

## 2. SAMMANDRAG OCH FÖRKLARING

*Helicobacter pylori* infektion är den viktigaste orsaken till kronisk magkatarr. En annan orsak till magkatarr och svår atrofisk magkatarr är den autoimmuna faktorn (1, 2). Detta kit är avsett att hjälpa vid diagnosen av en *H. pylori* infektion.

*Helicobacter pylori* är en spiralformad, gram-negativ bakterie som koloniserar människomagen. Organismen hittas i magens slemhinna som ligger över magens epitel och tycks ej invadera vävnader. Dock, slemmembranet under området för *H. pylori* kolonisationen är ständigt inflammerat; detta tillstånd kallas kroniskt ytlig eller icke-atropisk magkatarr, vilket, i fall det ej behandlas, fortsätter livet ut (1). Denna kroniska inflammatoriska process kan leda till atopisk magkatarr, vilket har kopplats till peptisk sårbildning och magcancer, två viktiga sjukdomar i det övre gastrointestinala traktatet (3-6). Närvaron av antikroppar mot CagA *H. pylori* stammar har blivit kopplade till uppkomsten av atopisk magkatarr i kroppen (7). Epidemiologisk bevisning indikerar en länk mellan gastrisk adenocarcinoma, slemhinneassocierad lymfvävnad (MALT) lymfor (8,9) samt *H. pylori* infektion.

## 3. PRINCIPEN FÖR TESTET

Detta *H. pylori* IgG antikroppar ELISA test är baserat på en enzym immunnprövningsteknik med delvis renat *H. pylori* bakteriell antigen adsorberat på en microplatta och en diagnosticerande antikropp märkt med pepparrots peroxididas (HRP).

Analysen fortsätter i enlighet med följande reaktioner:

1. Delvis renat *H. pylori* bakteriell antigen fäst vid brunnarnas polystyrenyta binder de *H. pylori* IgG antikroppar som är närvarande i provet.

2. Brunnarna tvättas för att avlägsna kvarblivet prov.
3. HRP konjugerad monoclonal antihuman IgG faster vid *H. pylori* antikropparna.
4. Brunnarna tvättas och TMB substratet tillförs. Substratet oxideras av enzymen, med bildning av blå slutprodukt som resultat.
5. Enzymreaktionen avslutas med stopplösningen. *H. pylori* – positiva prover färgas gula med beräknade värden om >30 EIU.

#### 4. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

För diagnostisk användning *in vitro*.

**VARNING: Hantera plasma and serum prover som potentiellt bioriskabelt materiel.**

Samtliga prover bör betraktas som potentiellt kontaminerade och behandlas som om de vore smittsamma. Vänligen referera till U. S. Department of Health and Human Services (Bethesda, MD., USA) publikationen Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999, 4th ed. (CDC/NIH) och Nr. (CDC) 88-8395 eller vilka som helst andra lokala eller nationella regler eller rapporter angående laboratoriers försiktighetsåtgärder gällande olika sjukdomar.

Detta kit innehåller reagenser vilka framställts ur mänskliga blodkomponenter. Källmaterialen vilka ingår i detta kit har testats för närvaron av antikroppar mot hepatit B och C, liksom för antikroppar mot HIV, och befunnits negativa. Emellertid, eftersom ingen testmetod absolute kan garantera att dessa patogener är frånvarande, bör samtliga försiktighetsåtgärder iakttas vid hanteringen av blodderivat.

Använd alltid skyddshandskar vid hantering av prover från patienter. Använd en säkerhetsanordning för pipetter för samtliga tillfällen då pipetter används. Sug aldrig upp vätska i pipetten med munnen. Läs samtliga instruktioner innan utförande av denna analys. Förstör alla reagenser som ingår i detta kit genom att hålla dem i en diskbank och frikostigt spola med kranvatten.

#### 5. INSAMLING OCH HANTERING AV PROV

Blodprov insamlas genom åderpunktering i en EDTA eller serum rör av

plast. Blodrör för plasma blandas omedelbart genom att vända dem upp och ner 5-6 gånger, och rör för plasma tillåts att levra sig (under minst 30 minuter vid rumstemperatur (20-25°C). Serum separeras efter levring, och plasma separeras omedelbart genom centrifugering (t.ex. plasttub, relativ centrifugal kraft upp till 2000G, 10-15 minuter). Plasma/serum kan förvaras kyld (2-8 °C) under tre dagar. För längre förvaring bör proven förvaras frysta (helst vid -70°C, alternativt vid -20°C). Blanda proven grundligt efter upptining. Undvik återkommande nerfrysningar och upptiningar av proven. Kraftigt hemolysta, lipemiska eller grumliga prover bör undvikas.

## **6. KITTETS INNEHÅLL, PREPARERING AV REAGENSER SAMT STABILITET FÖR DE LEVERERADE MATERIALEN**

De levererade reagenserna är tillräckliga för 96 brunnar och tre separata körningar. Reagenser från olika satser bör ej blandas.

### **6.1. Microplatta (Microplate)**

**Innehåll:** x 8 remsor i ram som bestrukna med delvis renat *H. pylori* bakteriell antigen.

**Beredning:** Färdig att användas.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum. Kassera remsorna efter användning.

### **6.2. Koncentrat för tvättbuffert (Washing Buffer Concentrate) (10x)**

**Innehåll:** 120 mL av 10 x fosfatbuffrat saliniskt (PBS) koncentrat innehållande Tween 20 och 0.1% ProClin 300 såsom konserveringsmedel.

**Beredning:** Späd ut 1 till 10 (t.ex. 100 mL + 900 mL) med destillerat vatten och blanda ordentligt.

**Stabilitet:** Den utspädda blandningen är stabil under två veckor som kylt (2-8°C).

### **6.3. Utspädningsbuffert (Diluent Buffer)**

**Innehåll:** 100 mL fosfatbuffert innehållande blockerande protein, Tween 20, 0.1% ProClin 300 såsom konserveringsmedel samt extrakt av rött färgämne.

**Beredning:** Färdig att användas.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum.

### **6.4. Kalibrator (Calibrator)**

**Innehåll:** En ampull innehållande 1.5 mL mänsklig serumbaserad

*H. pylori* IgG kalibrator med 0.1% ProClin 300 såsom konserveringsmedel. EIU-värdet för kalibratoren är tryckt på ampullens etikett.

**Beredning:** Färdig att användas.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum.

#### **6.5. Negativ Kontroll (Negative Control)**

**Innehåll:** En ampull innehållande 1.5 mL omänsklig serumbaserad *H. pylori* IgG negativ kontroll med 0.1% ProClin 300 såsom konserveringsmedel. EIU-värdet för kontrollserumet är tryckt på ampullens etikett.

**Beredning:** Färdig att användas.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum.

#### **6.6. Positiv Kontroll (Positive Control)**

**Innehåll:** En ampull innehållande 1.5 mL mänsklig serumbaserad *H. pylori* positiv kontroll med 0.1% ProClin 300 såsom konserveringsmedel. EIU-värdet för kontrollserumet är tryckt på ampullens etikett.

**Beredning:** Färdig att användas.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum.

#### **6.7. Konjugeringslösning (Conjugate Solution)**

**Innehåll:** 0.2 mL HRP-konjugerad monoklonal antihuman IgG in stabiliserande buffert med 0.02% methylisothiazolon och 0.02% bromonitrodioxan och 0.002% andra aktiva isothiazoloner såsom konserveringsmedel.

**Beredning:** Späd ut 1 till 100 (t.ex. 40 µL + 3960 µL) med den förtunnande bufferten.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum. Kassera överbliven förtunnad konjugeringslösning efter användandet.

#### **6.8. Substratlösning (Substrate Solution)**

**Innehåll:** 15 mL of tetramethylbenzidine (TMB) in aqueous solution.

**Beredning:** Färdig att användas.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum. Undvik direkt ljusexponering.

#### **6.9. Stopplösning (Stop Solution)**

**Innehåll:** 15 mL of 0.1 mol/L sulfuric acid.

**Beredning:** Färdig att användas.

**Stabilitet:** Stabil fram till utgångsdatum.

## 6.10. Inkubationstäckning

Fyra plastdukar för att täcka microplattan under inkubationen.

## 6.11. Användningsinstruktioner

## 7. MATERIAL SOM ERFODRAS MEN EJ INGÅR

- Destillerat eller dejoniserat vatten
- Micropipetter och engångs- spetsar, vilka noggrant kan mata ut 5 – 1000  $\mu\text{L}$
- Pipetter för att noggrant mata ut 1-10 mL
- 8-kanals pipett som levererar 100  $\mu\text{L}$
- Graderad cylinder, 1000 mL
- Vortex mixer för provlösningar
- Provrör för provlösningar
- Tvättanordning för microplattor
- Pappershanddukar eller absorberande papper
- Tidtagare
- Inkubator 37°C
- Läsare för microplatta, 450 nm
- T.ex. plaströr för blodinsamling för serum eller plasma
- Behållare för is

## 8. FÖRVARING OCH STABILITET

Förvara *Helicobacter pylori* IgG kittet kyld (2-8 °C). Vid förvaring vid dessa temperaturer är kittet stabilt fram till utgångsdatumet som är tryckt på lådans etikett och på var individuell komponents etikett i kittet. Frys ej ner eller utsätt kittet för höga temperaturer, och lagra ej i värme över 8°C när det inte används. Substratlösningen är känslig för ljus. Microplattan eller individuella remsor bör ej avlägsnas från foliepåsen före de fått i jämvikt-släge med rumstemperatur (20-25 °C). Oanvända remsor bör återbördas till foliepåsen, förseglas och uppbevaras vid 2-8°C.

Använd ej reagenser efter utgångsdatumet som anges på etiketten. Använd ej reagenser från kätten med olika satsnumror eller ersättningsreagenser från kätten från andra tillverkare. Använd enbart destillerat eller dejoniserat vatten. Kittets komponenter levereras med exakta koncentrationer. Vidare utspädning eller andra ändringar av reagenserna kan

åstadkomma felaktiga resultat.

### **Indikation om Kittets Försämring**

Vätskekomponenter bör icke vara synbart grumliga eller innehålla utfäll-  
da partiklar. Vid 2-8°C, kan dock tvättbufferten delvis kristalliseras, men  
kristallerna kommer att lösas upp vid blandning vid rumstemperatur (20-  
25°C). Substratblandningen bör vara färglös eller ljusblå. Vilken annat  
färg som helst indikerar försämring av substratlösningen.

### **Provens uppevaring och stabilitet**

Resultaten från studien om uppevaring och nedfrysning/upptining  
visade att skillnader i stabilitet observerades för prover som var *H. pylori*  
negativa, gränsfall, eller klart *H. pylori* positiva. Stabiliteten för lågpositiva  
prover utvärderades ej.

## **9. TESTETS TILLVÄGAGÅNGSSÄTT**

### **PRELIMINÄRAFÖRBEREDELSE**

Tillåt samtliga reagenser samt microplattan att uppnå rumstemperatur  
(20-25°C). Värm upp inkubatorn till 37°C. Späd ut tvättbuffer koncentratet  
1 till 10 (t.ex. 100 ml + 900 ml) med destillerat eller dejoniserat vatten.

**Läs den kompletta provproceduren före start. Det rekommenderas  
att kalibratorn, controller samt prover tillförs plattan i dubblerade  
brunnar. Det är nödvändigt att använda kalibratorn och kontrollerna  
i varje provkörning.**

Blanda väl alla reagenser före användning.

### **STEG 1: UTSPÄDNING AV PROVET**

Späd de blandade plasma eller serum proven 1 to 200 (5 µL + 995 µL)  
med utspädningsbufferten, **blanda väl**.

### **STEG 2: PROVEN**

Blanda och överför med pipett 100 µL av utspädningsbuffert (BLANK), ka-  
libratorn (CAL), den negativa kontrollen (NC), den positiva kontrollen (PC)  
samt utspädda prover (S1, S2, S3 etc.) in i brunnarna såsom duplikat (Se  
Figur 1). Täck plattan med inkubationsskyddet. Inkubera i 30 minuter vid  
37°C. Observera: Det rekommenderas att proven fördelas in i brunnarna  
inom 10 minuter för att undvika proberingsdrift inom plattan.

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	Blank	Blank			
<b>B</b>	CAL	CAL			
<b>C</b>	NC	NC			
<b>D</b>	PC	PC			
<b>E</b>	S1	S1			
<b>F</b>	S2	S2			
<b>G</b>	S3	S3			
<b>H</b>	etc.	etc.			

**Figur 1. Överföringsföljd med pipett.**

### STEG 3: TVÄTTNING

Rengör remsorna med 3 x 350 µL av den utspädda rengöringsbufferten, och klappa försiktigt den vända plattan några gånger mot en ren pappershandduk för att avlägsna eventuellt överbliven rengöringsbuffert.

### STEG 4: KONJUGERINGSLÖSNING

Överför 100 µL av den blandade spädningen (1 to 100) av konjugeringslösning in i brunnarna med en 8-kanals pipett. Täck över plattan med inkubationstäckningen. Inkubera under 30 minuter vid 37°C.

### STEG 5: TVÄTTNING

Rengör remsorna med 3 x 350 µL av den utspädda rengöringsbufferten, och klappa försiktigt den vända plattan några gånger mot en ren pappershandduk för att avlägsna eventuellt överbliven rengöringsbuffert.

### STEG 6: SUBSTRATLÖSNINGEN

Pöverför 100 µL av substratlösningen in i de tömda brunnarna med en 8-kanals pipett. Starta inkubationstidtagaren efter att substratlösningen överförs med pipett i den första remsan och fortsätt inkubationen i 30 minuter vid rumstemperatur (20-25°C). Undvik direkt utsättning för ljus under inkubationen.

### STEG 7: REAKTION STOPP

Överför 100 µL av stopplösningen med en 8-kanals pipett in i brunnarna.

### STEG 8: MÄTNING AV RESULTATEN

Mät absorberbarheten vid 450 nm inom 30 minuter.

## 10. RESULTAT

### 10.1. Värden för Kvalitetskontroll

1) Kalibratören och kontrollerna vilka ingår i kittet bör användas i var provkörning. Tabeller över kvalitetskontroll bör upprätthållas för att kunna följa kontrollernas prestation, eller så bör lämpliga statistiska metoder användas för att analysera kontrollvärden, vilka bör falla inom de lämpliga förlitningsintervaller som används inom vart laboratorium. Fodringen är att positiva kontroller bör vara positiva och negativa kontroller negativa i enlighet med de värden som fastställts i vart laboratorium. Väntade kontrollresultat måste erhållas för att provresultaten skall kunna godkännas.

2) Testets korrekta funktion kan verifieras genom att observera kalibratörens uppsugningsvärde. Avläsningen för kalibratörens uppsugning bör vara  $> 1\ 000$ .

### 10.2. Beräkning av Resultaten

Beräkna genomsnittet för uppsugningsvärdet (A) för kalibratören, kontrollerna och patientproven analyserade i duplikat. Dra av det tomma värdet från de kalkylerade genomsnittsvärdena för uppsugning.

Beräkna enzymimmunitetsenheterna (EIU) enligt följande:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Prov}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrator}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})} \times 100 = \text{Prov EIU}$$

### 10.3. Tolkning av Resultaten

Negativ  $< 30$  EIU

Positiv  $\geq 30$  EIU

Ett värde mindre än 30 EIU indikerar ett negativt resultat, eller att inga *H. pylori* antikroppar har upptäckts, eller att antikropparna befinner sig under påvisbar nivå. Ett värde om 30 EIU eller över indikerar att *H. pylori* antikroppar har upptäckts, och resultatet är därför positivt. I kvalitetssyfte, måste negativa och positiva kontroller som ingår i kittet testas vid varje prov. Förväntade kontrollresultat måste ernås för att testresultaten skall godkännas. Storleken av det uppmätta resultatet över brytvärdet är inte indikativt för det totala värdet av närvarande antikroppar. Brytvärdena har bestämts genom användning av Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA

kittet. Från patienter vars prover ger värden nära brytpunkten bör ett andra prov utföras, om möjligt inom en rimlig tidsperiod. Varje laboratorium etablera sin egen skala av förväntade värden för den kliniska situation där *H. pylori* IgG antikroppars värden används för diagnos. Dessutom kan de fastställda *H. pylori* IgG resultaten för ett specifikt exemplar eller med prov från olika tillverkare variera beroende på skillnader i provtagningsmetoder och reagensnoggrannhet. Resultat erhållna genom andra testmetoder från andra tillverkare bör ej användas utbytbart.

#### **10.4. Förväntade Värden**

De flesta personer som utsätts för *H. pylori* utvecklar IgG antikroppar mot organismen (2,5,6). Åldersspecifika värden för närvaron av *H. pylori* antikroppar är liknande för män och kvinnor. Förekomsten av *H. pylori* infektion är 30-40% i U.S.A., Kanada, samt i Västeuropa, ungefär 20 % i Australien, och 70-90% in Östeuropa, Afrika, Sydamerika och Asien. Många patienter som har positiva nivåer av antikroppar är asymptomiska, även om de bär på *H. pylori*. Därför motsvarar inte nödvändigtvis nivån av antikroppar mot allvaret av de kliniska symptomen.

### **11. FÖRFARINGSSÄTTETS BEGRÄNSNINGAR**

Såsom med vilket som helst diagnostiskt förfaringsätt bör Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA resultaten tolkas tillsammans med patientens kliniska framställning samt all övrig information som är tillgänglig för läkaren. Ett positivt test för förhöjda antikroppar kan ernås hos patienter som nyligen behandlats för en *H. pylori* infektion.

### **12. UTFÖRANDETS KÄNNETECKEN**

#### **Reproducerbarhet och Ofullständighet**

Variation inom proven

En panel omfattande tio (10) prov (ett negativt, sju gränsfall, ett positivt och ett högpositivt prov) användes för att bestämma variation inom proven. Proven mättes i duplikat i fyrtio (40) olika körningar under 20 arbetsdagar.

För serum prov, varierade den genomsnittliga variationskoefficienten (%CV) från 4.2 till 7.0% och för EDTA prov från 4.2 till 8.1%. Genomsnittet %CV för gränsfall inom serumprov var 6.3% (skala 5.4 – 7.0%) och för gränsfall inom EDTA prov 6.1% (skala 5.0 – 8.1%).

## Variation inom proven

A panel bestående av fyra (4) serumprov (ett negativt, ett gränsfall, ett positivt och ett högpositivt) användes för variation inom prover. Proven mättes i tjugotvå (22) enstaka prov i en körning och medeltalet från tre (3) olika körningar räknades ut.

För serumprov, omfattade variationskoefficienten (%CV) från 3.8 till 4.6% och för EDTA prov från 3.5 till 4.9%.

## Procentuell Överensstämmelse

Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA kittet utvärderades i tre studier omfattande 523, 187 och 134 patientprov från åldersgrupper från 20 till 89 år.

### Jämförd med kultur, uppvisade *Helicobacter pylori* IgG ELISA kittet följande prestanda:

N=523		Culture	
		Positiv	Negativ
Biohit Diagnostics	Positiv	166	9
	Negativ	7	341

Clinical Sensitivity	96.5% (95%CI= 92.6 - 98.4%)
Clinical Specificity	96.0% (95%CI= 93.4 - 97.6%)

### Jämförd med histologi, uppvisade *Helicobacter pylori* IgG ELISA kittet följande prestanda:

N=187		Histology	
		Positiv	Negativ
Biohit Diagnostics	Positiv	52	8
	Negativ	9	118

Percent Positive Agreement	85.2%
Percent Negative Agreement	93.7%

*Helicobacter pylori* IgG ELISA testet jämfördes med ett annat kom-

mersiellt ELISA för *H. pylori* antikroppar och uppvisade följande prestanda:

N=134		Commercial ELISA	
		Positive	Negative
Biohit Diagnostics	Positive	32	1
	Negative	3	98

Percent Positive Agreement	91.4%
Percent Negative Agreement	99.0%

### Analytisk sensitivitet

Sensiviteten för *H. pylori* IgG ELISA fastställdes i enlighet med riktlinjerna för NCCLS (CLIA) Consensus Standards for Medical Testing (NCCLS EP17-A).

Gränsvärdet för omärkta (LoB) fastställdes såsom den 95:e procent-satsen under vilket mätresultaten för 60 omärkta prover (omärkt lösning) faller. LoB befanns vara 1.1 EIU.

Gränsen för upptäckt (LoD), vilken är den lägsta faktiska mängd av analysning som kan upptäckas med 95% säkerhet, fastställdes genom användning av fyra EDTA plasma och serum prov som innehåller nivåer av antikroppar nära de observerade LoB värdet. LoD befanns vara 1.8 EIU för både EDTA plasma och serum proverna.

Nivån för kvantifiering (LoQ), t.ex. den lägsta mängd av analysning i ett prov som med säkerhet kan fastställas, beräknades, med antagande av en variationskoefficient (CV%) på 20 % vid nivån av LoD. Följaktligen, beräknades LoQ vara  $1.2 \times \text{LoD} = 2.2$  EIU för både EDTA plasma and serum proverna.

## 13. UTGIVNINGSDATUM

***Helicobacter pylori* IgG ELISA kit inlägg.**

Version 01, 25.06.2009.

## 14. GARANTI

Tillverkaren skall åtgärda samtliga upptäckta fel i vilken som helst Produkt ("Den Felaktiga Produkten") som beror på olämpligt material eller vårdslöst hantverk och vilket förhindrar den mekaniska funktionen eller avsedda användningen av Produkterna omfattande, dock icke begränsade till, de funktioner som fastställts i Tillverkarens specifikationer för Produkten. GARANTIN KOMMER DOCK ATT ANSES OGILTIG OM FELET BEFINNS HA ORSAKATS AV FELAKTIG HANTERING, MISSBRUK, OAVSIKTLIG SKADA, FELAKTIG FÖRVARING ELLER ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA FÖR VERKSAMHET UTANFÖR DERAS SPECIFICERADE BEGRÄNSNINGAR ELLER UTANFÖR DERAS SPECIFIKATIONER, I MOTSATS TILL DE INSTRUKTIONER SOM ANGES I INSTRUKTIONSMANUALEN.

Perioden för denna garanti för Distributören är angiven i Produkternas instruktionsmanual och inleds vid det datum som den relevanta Produkten avsänds från Tillverkaren. I fall av tolkningsdispyter är det den engelska texten som gäller.

Samtliga Biohit diagnostiska kittar har tillverkats in enlighet med våra ISO 9001 / ISO 13485 protokoll för kvalitetsbehandling och har genomgått alla relevanta procedurer gällande Kvalitetsförsäkringen som har samband med dessa produkter.

## 15. EN KORT ÖVERSIKT AV PROCEDUREN

Låt alla reagenser uppnå rumstemperatur (20-25°C)  
Kom ihåg att blanda alla reagenser och prover för överföring med pipett

\*

Efter blandandet, överför med pipett 100 µL av den omärkta lösningen, kalibratorerna, kontrollen och de utspädda (1 to 200) patient proven in i brunnarna

\*

Inkubera under **30 min vid 37°C**

\*

Rengör brunnarna 3 gånger med 350 µL av den utspädda rengöringsbuffern

\*

Överför med pipett 100 µL av den utspädda (1 to 100 utspädning) och blandade konjugationslösningen in i brunnarna

\*

Inkubera under **30 min vid 37°C**

\*

Rengör brunnarna 3 gånger med 350 µL av den utspädda rengöringsbuffern

\*

Överför med pipett 100 µL av den blandade substratlösningen in i brunnarna

\*

Inkubera under **30 min** vid rumstemperatur (**20-25°C**)

\*

Överför med pipett 100 µL av den blandade stopplösningen in i brunnarna

\*

**Avläs** vid 450 nm **inom 30 minuter**

## GEBRAUCHSANLEITUNG

*Helicobacter pylori* IgG ELISA

Cat. Nr. 601040.02

## INHALT

1. ANWENDUNGSGEBIET .....	47
2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG.....	47
3. TESTPRINZIP .....	47
4. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE .....	48
5. SAMMLUNG UND HANDHABUNG DER PROBEN.....	49
6. PACKUNGSINHALT, REAGENZIENANSÄTZE UND STABILITÄT- SHINWEISE .....	49
6.1. Mikrotiterplatte (Microplate).....	49
6.2. Waschpufferkonzentrat ( Washing Buffer Concentrate) (10-fach)	49
6.3. Verdünnungspuffer (Diluent Buffer).....	50
6.4. Kalibrator (Calibrator).....	50
6.5. Negativkontrolle (Negative Control) .....	50
6.6. Positivkontrolle (Positive Control) .....	50
6.7. Konjugatlösung (Conjugate Solution).....	50
6.8. Substratlösung (Substrate Solution) .....	51
6.9. Stopplösung (Stop Solution) .....	51
6.10. Abdeckfolien .....	51
6.11. Arbeitsanleitung.....	51
7. ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHES ARBEITSMATERIAL .....	51
8. LAGERUNG UND STABILITÄT.....	51
9. TESTDURCHFÜHRUNG .....	52
10. ERGEBNISSE .....	54
10.1. Werte der Qualitätskontrolle.....	54
10.2. Berechnung der Ergebnisse.....	54
10.3. Interpretation der Ergebnisse.....	55
10.4. Erwartete Werte .....	55
11. GRENZEN DES VERFAHRENS .....	56
12. TESTSPEZIFIKATIONEN.....	56
13. AUSSTELLUNGSDATUM .....	58
14. GARANTIE .....	58
15. KURZDARSTELLUNG DES ABLAUF.....	60

ANHANG: ZERTIFIKAT ZUR QUALITÄTSKONTROLLE

## 1. ANWENDUNGSGBIET

Der *Helicobacter pylori* IgG Enzym-Immuntest (ELISA) für die qualitative Bestimmung von Antikörpern der menschlichen IgG Klasse zum *Helicobacter pylori* in EDTA Plasma und Serum angewandt. Der Test wird zur Unterstützung bei der Diagnostik einer *Helicobacter pylori* Infektion bei Erwachsenen mit den klinischen Symptomen einer Magenschleimhautentzündung (Gastritis) angewandt. DIENT ZUR *IN VITRO*-DIAGNOSTIK.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Die Infektion mit dem *Helicobacter pylori* ist die häufigste Ursache für eine chronische Magenschleimhautentzündung. Als weitere Ursache für eine Gastritis und die schwere atrophische Gastritis gilt die Autoimmunreaktion, die auch durch die *H. pylori* Infektion ausgelöst werden kann (1, 2). Dieser Test wird zur Unterstützung bei der Diagnose einer *H. pylori* Infektion angewandt.

Das *Helicobacter pylori* ist ein spiralförmiges, gramnegatives Bakterium, das den menschlichen Magen befällt. Das Bakterium findet man auf der Magenschleimhaut, die das gastrische Epithelium bedeckt und es scheint nicht in das Gewebe einzudringen. Jedoch ist die Schleimhaut unterhalb des Befalls durch das *H. pylori* immer entzündet; dieser Zustand wird als chronische oberflächliche oder nicht-atrophische Gastritis bezeichnet, die unbehandelt ein Leben lang anhält (1). Dieser Prozess der chronischen Entzündung kann zu einer atrophischen Gastritis führen, die im Zusammenhang mit der Entwicklung von peptischen Geschwüren und Magenkrebs steht, den zwei wichtigsten Erkrankungen des oberen Magen-Darm-Traktes (3-6). Die Anwesenheit von Antikörpern zu den CagA *H. pylori* Stämmen steht im Zusammenhang mit der Entwicklung der atrophischen Gastritis im Korpus (7). Die epidemiologischen Anzeichen weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem gastritischen Adenokarzinom, dem MALT-Lymphom (8,9) und der *H. pylori* Infektion hin.

## 3. TESTPRINZIP

Dieser ELISA Test zu *H. pylori* IgG Antikörpern basiert auf der Technik der Enzym-Immunoassay mit teilweise gereinigtem *H. pylori* bakteriellem Antigen, welches auf einem Mikrotiter fixiert wird und durch Zugabe eines

mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiertem Antikörper ermittelt wird.

Die Probe durchläuft folgende Reaktionen:

1. Das teilweise gereinigte *H. pylori* bakterielle Antigen, das an die Polystyroloberfläche der Platte fixiert ist, bindet die *H. pylori* IgG Antikörper aus der Probe.
2. Nach der Inkubation wird die Platte zur Entfernung der Rückstände von der Probe gewaschen.
3. Das HRP-markierte monoklonale nicht-menschliche IgG bindet die *H. pylori* Antikörper aus der Probe.
4. Nach einem weiteren Waschvorgang wird das TMB-Substrat beigelegt. Das Substrat wird durch das Enzym oxidiert, was zu einem blauen Farbumschlag führt.
5. Die Enzymreaktion wird mit der Stopplösung beendet. *H. pylori*-positive Proben färben sich gelb bei einem berechneten Wert von >30 EIU.

#### **4. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE**

**Anwendung für *in vitro* diagnostische Zwecke.**

**VORSICHT: Behandeln Sie die Plasma- und Serumproben als potentiell gefährliches biologisches Material.**

Alle Proben sollten als potentiell verunreinigt betrachtet werden und als infektiös behandelt werden. Bitte beachten Sie die Veröffentlichung des U. S. Department of Health and Human Services (Bethesda, MD., USA), 1999, 4th ed. (CDC/NIH) und No. (CDC) 88-8395 bezüglich Laborsicherheitsvorschriften oder jegliche anderen lokalen oder nationalen Vorschriften zu Sicherheitsmaßnahmen im Labor für Abläufe zu verschiedenen Krankheiten.

Der Test enthält Reagenzien, die aus menschlichen Blutbestandteilen hergestellt wurden. Das für diesen Test verwendete Material wurde auf Antikörper zu Hepatitis B und C sowie auf Antikörper zu HIV getestet und als negativ befunden. Da jedoch keine Testmethode die absolute Sicherheit geben kann, dass keines dieser Pathogene vorliegt, sollten alle Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit Blutderivaten beachtet werden.

Verwenden Sie beim Umgang mit den Proben der Patienten daher immer Schutzhandschuhe. Für alle Pipettierschritte müssen sichere

Pipettierhilfen verwendet werden. Niemals mit dem Mund pipettieren. Lesen Sie die Testanleitung vor der Durchführung des Tests sorgfältig durch. Alle Reagenzienbestandteile des Tests können in den Abguss entsorgt werden. Danach mit reichlich Leitungswasser nachspülen.

## 5. SAMMLUNG UND HANDHABUNG DER PROBEN

Die Blutprobe wird über eine Venipunktur z.B. in eine Plastik-EDTA oder in ein Serumröhrchen entnommen. Die Blutröhrchen für Plasma werden gemischt, indem sie 5-6 Mal hoch und runter gewendet werden und die Röhrchen für das Serum werden zur Gerinnung (für mindestens 30 Minuten) bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen gelassen. Nach der Gerinnung wird das Serum abgesondert und das Plasma wird sofort durch Zentrifugierung abgesondert.

(z.B. Plastikröhrchen, relative Zentrifugalkraft bis 2000 G, 10-15 Minuten). Das Plasma/ Serum kann gekühlt (2-8 °C) drei Tage lang aufbewahrt werden. Für längere Lagerung müssen die Proben tiefgekühlt (vorzugsweise bei -70°C, alternativ bei -20°C aufbewahrt werden). Mischen Sie die Proben gut nach dem Auftauen. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben. Stark hämolytische, lipämische oder trübe Proben sollten vermieden werden.

## 6. PACKUNGSINHALT, REAGENZIENANSÄTZE UND STABILITÄTSHINWEISE

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte und drei getrennte Abläufe. Die Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt werden.

### 6.1. Mikrotiterplatte (Microplate)

**Inhalt:** 12 x 8 Streifen im Plattenrahmen und beschichtet mit teilweise gereinigtem *H. pylori* bakteriellem Antigen.

**Vorbereitung:** Gebrauchsfertig.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum. Nach dem Benutzen die Streifen wegwerfen.

### 6.2. Waschpufferkonzentrat ( Washing Buffer Concentrate) (10-fach)

**Inhalt:** 120 mL 10-fach konzentrierte Phosphatpufferlösung (PBS) mit

Tween 20 und 0.1 % ProClin als Konservierungsmittel.

**Vorbereitung:** Verdünnung 1 zu 10 (e.g. 100 mL + 900 mL) mit destilliertem Wasser . Danach gut mischen.

**Haltbarkeit:** Der verdünnte Waschpuffer ist gekühlt (2-8°C) zwei Wochen haltbar.

### **6.3. Verdünnungspuffer (Diluent Buffer)**

**Inhalt:** 100 mL Phosphatpuffer mit Blockierungsprotein, Tween 20, 0.1% ProClin 300 als Konservierungsmittel und rotem Farbstoff.

**Vorbereitung:** Gebrauchsfertig.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum.

### **6.4. Kalibrator (Calibrator)**

**Inhalt:** 1 Fläschchen mit 1.5 mL menschlichem serumbasiertem *H. pylori* IgG Kalibrator mit 0.1% ProClin 300 als Konservierungsmittel. Der EIU-Wert des Kalibrators ist auf das Fläschchenetikett aufgedruckt.

**Vorbereitung:** Gebrauchsfertig.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum.

### **6.5. Negativkontrolle (Negative Control)**

**Inhalt:** 1 Fläschchen mit 1.5 mL menschlicher serumbasierter *H. pylori* IgG-negativer Kontrolle mit 0.1% ProClin 300 als Konservierungsmittel. Der EIU-Wert des Kalibrators ist auf das Fläschchenetikett aufgedruckt.

**Vorbereitung:** Gebrauchsfertig.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum.

### **6.6. Positivkontrolle (Positive Control)**

**Inhalt:** 1 Fläschchen mit 1.5 mL menschlicher serumbasierter *H. pylori* IgG-positiver Kontrolle mit 0.1% ProClin 300 als Konservierungsmittel. Der EIU-Wert des Kalibrators ist auf das Fläschchenetikett aufgedruckt.

**Vorbereitung:** Gebrauchsfertig.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum

### **6.7. Konjugatlösung (Conjugate Solution)**

**Inhalt:** 0.2 mL Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltes monoklonales nicht-menschliches IgG in Stabilisierungspuffer mit 0.02% Methylisothiazolon und 0.02% Bromonitrodioxan und 0.002% andere aktive Isothiazolone als Konservierungsmittel.

**Vorbereitung:** Verdünnung 1 zu 100 (z.B. 40  $\mu$ L + 3960  $\mu$ L) mit Verdünnungspuffer.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum. Reste der verdünnten Konjugatlösung nach Gebrauch wegwerfen.

### 6.8. Substratlösung (Substrate Solution)

**Inhalt:** 15 mL Tetramethylbenzidin (TMB) in wässriger Lösung.

**Vorbereitung:** Gebrauchsfertig.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum. Direkte Lichtaussetzung sollte vermieden werden.

### 6.9. Stopplösung (Stop Solution)

**Inhalt:** 15 mL 0.1 mol/L Schwefelsäure.

**Vorbereitung:** Gebrauchsfertig.

**Haltbarkeit:** Siehe aufgedrucktes Verfallsdatum.

### 6.10. Abdeckfolien

Vier Plastikfolien zur Abdeckung der Mikrotiterplatten während der Inkubation.

### 6.11. Arbeitsanleitung

## 7. ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHES ARBEITSMATERIAL

- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Wegwerfspitzen für genaue Übertragung von 5-1000  $\mu\text{L}$
- Pipetten für genaue Übertragung von 1-10 mL
- 8-Kanalpipette für 100  $\mu\text{L}$
- Messzylinder für 1000 mL
- Vortex-Mischer für Probenverdünnungen
- Teströhrchen für Verdünnungen
- Plattenwascher
- Papiertücher oder Löschpapier
- Zeitmesser
- Inkubator, 37 °C
- Plattenleser, 450 nm
- z.B. Plastikröhrchen zur Blutentnahme für Serum oder Plasma
- Eisbehälter

## 8. LAGERUNG UND STABILITÄT

Der *Helicobacter pylori* IgG Test muss gekühlt (2-8 °C) gelagert werden. Wird diese Temperatur eingehalten, bleibt der Test bis zum Verfallsdatum, das auf der Packung und jeder einzelnen Komponente aufgedruckt ist,

stabil. Bitte den Test nicht einfrieren oder hohen Temperaturen aussetzen oder bei über 8°C lagern, wenn er nicht verwendet wird. Die Substratlösung ist sehr lichtempfindlich. Die Mikrotiterplatten oder einzelnen Streifen sollten nicht aus der Plastikhülle entfernt werden, bevor sie nicht an die Raumtemperatur (20-25 °C) angepasst sind. Die Streifen, die nicht sofort verwendet werden, müssen wieder in der Folienverpackung kühl bei 2-8°C gelagert werden.

Nach dem Verfallsdatum sollen die Reagenzien nicht mehr verwendet werden. Die Reagenzien unterschiedlicher Chargen oder anderer Hersteller dürfen nicht eingesetzt werden. Benutzen Sie nur destilliertes oder entionisiertes Wasser. Die einzelnen Komponenten dieses Tests sind auf eine präzise Konzentration eingestellt und aufeinander abgestimmt worden. Weitere Verdünnungen oder Veränderungen beeinträchtigen die Richtigkeit der Ergebnisse.

### **Anzeichen eines Verfalls der Reagenzien**

Die flüssigen Komponenten sollten keinerlei sichtbare Trübung oder Zeichen einer Ausfällung zeigen. Bei der Lagerung des Waschpufferkonzentrats bei 2-8°C ist ein Ausfällen bzw. eine Flockung möglich, welche sich aber unter Mischen bei Raumtemperatur (20-25°C) wieder auflösen sollte. Die Substratlösung ist farblos bis hellblau. Andere Verfärbungen sind Zeichen des Verfalls der Substratlösung.

### **Lagerung und Stabilität der Proben**

Die Ergebnisse der Studie über Lagerung, Tiefgefrieren und Wiederauftauen haben keine Unterschiede in der Stabilität der Proben gezeigt, die entweder *H. pylori*-negativ, grenzwertig oder eindeutig *H. pylori*-positiv waren. Die Stabilität schwach positiver Proben wurde nicht berücksichtigt.

## **9. TESTDURCHFÜHRUNG**

### **VORBEREITUNGEN**

Alle Reagenzien und die Mikrotiterplatten auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Inkubator auf 37°C erwärmen. Das Waschpufferkonzentrat 1 zu 10 (z.B. 100 mL + 900 mL) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen. **Bitte vor dem Ansetzen die Testanleitung vollständig durchlesen. Es wird empfohlen den Kalibrator, die Kontrollen und Proben als Doppelbestimmung anzuwenden. In jedem Ansatz müs-**

## sen Kalibrator und Kontrollen angesetzt werden.

Alle Reagenzien vor dem Gebrauch gut mischen.

### SCHRITT 1: PROBENVERDÜNNUNG

Die gemischten Plasma- oder Serumproben 1 zu 200 ( $5 \mu\text{L} + 995 \mu\text{L}$ ) mit Verdünnungspuffer verdünnen **und gut mischen**.

### SCHRITT 2: PROBEN

Mischen und pipettieren Sie  $100 \mu\text{L}$  aus dem Verdünnungspuffer (Blank), dem Kalibrator (CAL), der Negativkontrolle (NC), der Positivkontrolle (PC) und verdünnten Proben (S1, S2, S3, usw.) jeweils als Doppelbestimmung (siehe Abbildung 1). Decken Sie die Platte mit der Abdeckfolie ab und inkubieren Sie sie für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ . Hinweis: Die Proben sollten innerhalb von ca. 10 Minuten pipettiert werden, um einen Drift auf der Platte zu vermeiden.

	1	2	3	4	5
A	Blank	Blank			
B	CAL	CAL			
C	NC	NC			
D	PC	PC			
E	S1	S1			
F	S2	S2			
G	S3	S3			
H	usw.	usw.			

### Abbildung 1. Pipettierschema.

### SCHRITT 3: WASCHSCHRITT

Waschen Sie die Streifen mit  $3 \times 350 \mu\text{L}$  verdünnter Waschlösung. Anschließend behutsam die Platte ein paar Mal auf einem sauberen Papiertuch ausklopfen, um die Reste der Waschlösung zu entfernen.

### SCHRITT 4: KONJUGATLÖSUNG

$100 \mu\text{L}$  der gemischten Verdünnung (1 zu 100) der Konjugatlösung mit einer 8-Kanalpipette in die Vertiefungen pipettieren. Decken Sie die Platte mit der Abdeckfolie ab und inkubieren sie für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ .

### SCHRITT 5: WASCHSCHRITT

Waschen Sie die Streifen mit  $3 \times 350 \mu\text{L}$  verdünnter Waschlösung. Anschließend behutsam die Platte ein paar Mal auf einem sauberen Papiertuch ausklopfen, um die Reste der Waschlösung zu entfernen.

## SCHRITT 6: SUBSTRATLÖSUNG

100  $\mu\text{L}$  der Substratlösung mit einer 8-Kanal Pipette in alle geleerten Vertiefungen pipettieren. Starten Sie die Uhr beim Pipettieren der Substratlösung in die erste Vertiefung und inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C). Während der Inkubation die Platte vor Licht schützen.

## SCHRITT 7: REAKTION STOP

100  $\mu\text{L}$  von der Stopplösung mit einer 8-Kanal Pipette in die Vertiefungen pipettieren.

## SCHRITT 8: MEASURING OF RESULTS

Messen Sie die Absorption bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten.

# 10. ERGEBNISSE

## 10.1. Werte der Qualitätskontrolle

1) Der Kalibrator und die Kontrollen sollen bei jedem Test mit verwendet werden. Die dabei ermittelten Werte der Kontrollen sollten graphisch dokumentiert werden, um die Durchführung der Kontrollen zu verfolgen. Zur Auswertung der Kontrolle sollte eine geeignete statistische Methode verwendet werden. Jedes Labor sollte für die Kontrollwerte seine eigenen Vertrauensbereiche festlegen. Der Anspruch liegt darin, dass nach den entsprechenden im jeweiligen Labor festgelegten Werten positive Kontrollen positiv und negative Kontrollen negativ sind. Erwartete Kontrollwerte müssen erzielt werden, damit die Testergebnisse akzeptiert werden.

2) Die Bestätigung der korrekten Durchführung eines Tests wird durch den Absorptionswert des Kalibrators angezeigt. Dieser sollte  $> 1.000$  betragen.

## 10.2. Berechnung der Ergebnisse

Errechnen Sie den mittleren Absorptionswert (A) für den Kalibrator, die Kontrollen und die von den Patienten entnommenen Proben in Duplizierung und ziehen Sie jeweils den Leerwert von den berechneten mittleren Absorptionswerten ab.

Berechnen Sie die Enzym-Immunoheiten (EIU) wie folgt:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Probe}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrator}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})} \times 100 = \text{Probe EIU}$$

### 10.3. Interpretation der Ergebnisse

Negativ < 30 EIU

Positiv ≥ 30 EIU

Ein Wert von weniger als 30 EIU zeigt ein negatives Ergebnis an bzw. dass keine *H. pylori* Antikörper entdeckt wurden oder dass die Antikörper unterhalb des erkennbaren Werts sind. Ein Wert von 30 EIU oder darüber zeigt an, dass *H. pylori* Antikörper festgestellt wurden und dass das Ergebnis daher positiv ist. Die Qualitätsmerkmale, negative und positive Kontrollen, die mittels dieses Tests geliefert werden, müssen jedes Mal mit getestet werden. Erwartete Kontrollwerte müssen erzielt werden, damit die Testergebnisse akzeptiert werden. Die Größenordnung des gemessenen Ergebnisses oberhalb des Cut-off-Wertes zeigt nicht die gesamte Anzahl der vorhandenen Antikörper an. Diese Cut-off-Werte wurden mit dem Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA-Test ermittelt. Von Patienten, deren Probenwerte stark in der Nähe des Cut-off-Werts lagen, sollten, nach Möglichkeit innerhalb eines vernünftigen Zeitraums, neue Proben genommen werden. Jedes Labor sollte sich einen eigenen Bereich von erwarteten Werten für die klinische Situation, wo die *H. pylori* IgG Antikörperwerte zur Diagnose benutzt werden, festlegen. Auch die *H. pylori* IgG Ergebnisse von Tests anderer Hersteller für eine bestimmte Probe können sich durch Unterschiede in der Testmethode oder der Spezifität der Reagenzien unterscheiden. Die Ergebnisse, die mit Testmethoden anderer Hersteller ermittelt wurden, dürfen nicht untereinander ausgetauscht werden.

### 10.4. Erwartete Werte

Die meisten der dem *H. pylori* Bakterium ausgesetzten Personen entwickeln IgG Antikörper gegen diesen Organismus (2,5,6). Die altersspezifischen Raten für das Vorhandensein von *H. pylori* Antikörpern sind ähnlich für Männer und Frauen. Die Prävalenz für *H. pylori* Infektionen beträgt 30-40% in den USA, Kanada und Westeuropa, ungefähr 20% in Australien und 70-90% in Osteuropa, Afrika, Südamerika und Asien.

Viele Patienten, die einen positiven Antikörperbefund aufweisen, zeigen keine Symptome, obwohl nachweislich eine Besiedelung durch *H. pylori* vorliegt. Daher korreliert die Höhe der nachgewiesenen Antikörper nicht notwendigerweise mit der Schwere der Symptomatik.

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei jedem anderen diagnostischen Verfahren, müssen auch die Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA Testergebnisse immer zusammen mit dem klinischen Bild des Patienten und weiteren, verfügbaren Informationen des Arztes interpretiert werden. Ein positives Testergebnis kann sich ebenfalls bei Patienten mit kürzlich behandelter akuter *H. pylori* Infektion zeigen.

## 12. TESTSPEZIFIKATIONEN

### Reproduzierbarkeit und Ungenauigkeiten

Variation bei verschiedenen Probenabläufen

Eine Palette aus zehn (10) Proben (eine negative, sieben grenzwertige, eine positive und eine stark positive Probe) wurden verwendet, um die Variation bei verschiedenen Probenahmen zu bestimmen. Die Proben wurden in duplizierter Form bei vierzig (40) verschiedenen Abläufen an 20 Werktagen genommen.

Für Serumproben lag der Koeffizient für die Variation (%CV) zwischen 4.2 und 7.0% und bei EDTA Proben zwischen 4.2 und 8.1%. Der durchschnittliche %CV Wert für grenzwertige Serumproben war 6.3% (Bereich von 5.4 – 7.0%) und für grenzwertige EDTA-Proben bei 6.1% (Bereich 5.0 – 8.1%).

Variation bei gleichem Probenablauf

Eine Palette von vier (4) Serumproben (eine negative, eine grenzwertige, eine positive und eine stark positive Probe) wurde für die Bestimmung der Variation innerhalb einer Probenahme benutzt. Die Proben wurden von zweiundzwanzig (22) einzelnen Proben aus einem Ablauf entnommen und der Durchschnitt von drei (3) verschiedenen Abläufen wurde berechnet.

Für Serumproben lag der durchschnittliche Koeffizient für die Variation (%CV) zwischen 3.8 und 4.6% und für die EDTA-Proben zwischen 3.5 und 4.9%.

### Prozentuale Übereinstimmungen

Der Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA-Test wurde in drei Studien mit jeweils 523, 187 und 134 Proben von Patienten im Alter von 20 bis 89 Jahren ausgewertet.

### Verglichen mit den kulturellen Nachweisverfahren zeigte der *Helicobacter pylori* IgG ELISA Test folgende Ergebnisse:

N=523		Kultur	
		Positiv	Negativ
Biohit Diagnostik	Positiv	166	9
	Negativ	7	341

Klinische Sensitivität	96.5% (95%CI= 92.6 - 98.4%)
Klinische Spezifität	96.0% (95%CI= 93.4 - 97.6%)

### Im Vergleich zu histologischen Nachweisverfahren zeigte der *Helicobacter pylori* IgG ELISA Test folgende Ergebnisse:

N=187		Histologie	
		Positiv	Negativ
Biohit Diagnostik	Positiv	52	8
	Negativ	9	118

Prozent Positiv Übereinstimmung	85.2%
Prozent Negativ Übereinstimmung	93.7%

### Der Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA Test wurde auch mit anderen im Handel erhältlichen ELISA Tests zur Bestimmung von *H. pylori* Antikörpern verglichen und zeigte folgende Ergebnisse:

N=134		Kommerziell ELISA	
		Positiv	Negativ
Biohit Diagnostik	Positiv	32	1
	Negativ	3	98

Prozent Positiv Übereinstimmung	91.4%
Prozent Negativ Übereinstimmung	99.0%

### **Analytische Sensitivität**

Die analytische Bestimmungsgrenze des Biohit *H. pylori* IgG ELISA Tests wurde in Übereinstimmung mit der NCCLS (CLIA) Richtlinie des Consensus Standards for Medical Testing (NCCLS EP17-A) festgelegt.

Der Grenzwert für leer (LoB) wurde auf das 95. Perzentil festgelegt, unter das die Messergebnisse von 60 leeren Proben (Leerlösung) fallen. Für das LoB wurde der Wert von 1.1 EIU gefunden.

Der Grenzwert für die Feststellung (LoD), welcher der niedrigste tatsächliche Wert der Analyten ist, der mit 95%-iger Sicherheit festgestellt werden kann, wurde unter Anwendung von vier EDTA Plasma- und Serumproben bewertet, die ein Antikörperriveau enthalten, das nahe am beobachteten LoB Wert liegt. Für das LoD wurde ein Wert von 1.8 EIU gefunden, sowohl für EDTA Plasma- als auch für Serumproben.

Der Grenzwert für die Quantifizierung (LoQ), d.h. die niedrigste Anzahl von Analyten in einer Probe, die zuverlässig festgestellt werden kann, wurde auf der Basis eines Variationskoeffizienten (CV%) von 20% auf der Ebene von LoD ermittelt. Entsprechend wurde der LoQ auf der Basis von  $1.2 \times \text{LoD} = 2.2$  EIU für die EDTA Plasma- und Serumproben ermittelt.

## **13. AUSSTELLUNGSDATUM**

### ***Helicobacter pylori* IgG ELISA Testanleitung.**

Version 01, 25.06.2009.

## **14. GARANTIE**

Der Hersteller haftet für alle Schäden des einzelnen Produkts (Produktschäden), die nachweislich durch fehlerhafte Materialien oder fahrlässige Arbeitsqualität entstanden sind und einschließlich solcher, die die mechanische Produktion oder die Anwendung des Produkts verhindern, aber begrenzt auf Funktionen, die in der Produktspezifikation des Herstellers definiert sind. DIE GARANTIE ERLISCHT BEI SCHÄDEN, DIE AUF UNSACHGEMÄSSE BEHANDLUNG, MISSBRAUCH, UNFALLSCHÄDEN

ODER FALSCHER LAGERUNG ZURÜCKZUFÜHREN SIND ODER WENN DIE PRODUKTE AUSSERHALB IHRER SPEZIFIZIERTEN EINSCHRÄNKUNGEN UND ENTGEGEN DEN ANWEISUNGEN IN DER VORLIEGENDEN GEBRAUCHSANLEITUNG VERWENDET WERDEN.

Die Dauer der Garantie für den Vertriebs Händler ist in der Testanleitung des Produktes definiert und beginnt mit dem Versanddatum des relevanten Produkts durch den Hersteller. Im Falle einer streitigen Interpretation gilt der englische Text.

Alle diagnostischen Tests von Biohit wurden nach unseren ISO 9001 / ISO 13485 Qualitätsmanagement-Protokollen hergestellt und haben alle relevanten Qualitätssicherungsverfahren bestanden.

## 15. KURZDARSTELLUNG DES ABLAUFES

Erlauben Sie eine Anpassung aller Reagenzien an die Raumtemperatur (20-25°C) Denken Sie daran, alle Reagenzien und Proben vor der Pipettierung gut zu mischen

\*

Nach dem Mischen Pipettierung von 100 µL von der leeren Lösung, den Kalibratoren, der Kontrolle und der verdünnten (1 zu 200) Patientenprobe in die Vertiefungen

\*

Inkubation für **30 Min. bei 37°C**

\*

Waschen der Vertiefungen, 3 Mal mit 350 µL von verdünntem Waschpuffer

\*

Pipettierung von 100 µL von der verdünnten (Verdünnung 1 zu 100) und gemischten Konjugatlösung auf die Vertiefungen

\*

Inkubation für **30 Min. bei 37°C**

\*

Waschen der Vertiefungen, 3 Mal mit 350 µL von verdünntem Waschpuffer

\*

Pipettierung von 100 µL von der gemischten Substratlösung in die Vertiefungen

\*

Inkubation für **30 Min. bei Raumtemperatur (20-25°C)**

\*

Pipettierung von 100 µL von der gemischten Stopplösung in die Vertiefungen

\*

**Ablesen** bei 450 nm innerhalb von **30 Minuten**

## Manuel d'instruction

*Helicobacter pylori* IgG ELISA

Cat. No. 601 040.02

## TABLE DES MATIERES

1. INDICATION .....	62
2. RESUME ET EXPLICATIONS .....	62
3. PRINCIPE DU TEST .....	62
4. MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS .....	63
5. PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	64
6. CONTENU DU COFFRET, PREPARATION DES REACTIFS ET STABILITE DU MATERIEL FOURNI .....	64
6.1. Microplaque (Microplate).....	64
6.2. Tampon de lavage concentré (Washing Buffer Concentrate) (10x)	64
6.3. Tampon de dilution (Diluent Buffer).....	65
6.4. Calibreur (Calibrator).....	65
6.5. Contrôle négatif (Negative Control).....	65
6.6. Contrôle positif (Positive Control).....	65
6.7. Solution de conjugué (Conjugate Solution).....	65
6.8. Solution de substrat ( Substrate Solution).....	66
6.9. Solution d'arrêt (Stop Solution) .....	66
6.10. Films d'incubation .....	66
6.11. Manuel d'instruction .....	66
7. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI .....	66
8. CONSERVATION ET STABILITE .....	66
9. MODE OPERATOIRE .....	67
10. RESULTATS .....	69
10.1. Valeur du contrôle qualité.....	69
10.2. Calcul des résultats.....	69
10.3. Interprétation des résultats.....	70
10.4. Valeurs attendues .....	70
11. LIMITES DE LA PROCEDURE.....	71
12. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES.....	71
13. DATE DE PUBLICATION .....	73
14. GARANTIE .....	73
15. ABREGE DE LA PROCEDURE.....	75

ANNEXE : CERTIFICAT DE CONTROLE DE QUALITE

## 1. INDICATION

Le test ELISA IgG *Helicobacter pylori* est basé sur la réaction immuno-enzymatique sur microplaque (ELISA) pour la détection qualitative des anticorps humains IgG dirigés contre l'*Helicobacter pylori* dans le sérum et le plasma-EDTA. Le test est une aide pour le diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori* chez les patients adultes avec des symptômes cliniques de gastrite. A UTILISER POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO.

## 2. RESUME ET EXPLICATIONS

L'infection à *H. pylori* est la cause la plus importante de la gastrite chronique. Un autre mécanisme à l'origine des gastrites chroniques ou atrophiques graves est le mécanisme auto-immunitaire (1, 2). Ce test constitue une aide au diagnostic de l'infection à *H. pylori*.

L'*Helicobacter pylori* est une bactérie hélicoïdale, Gram négative, qui colonise l'estomac humain. Cet organisme est présent dans la couche de muqueuse de l'estomac recouvrant l'épithélium gastrique et il ne semble pas envahir les tissus. Cependant, la membrane muqueuse sous la zone de colonisation par *H. pylori* est invariablement enflammée; cet état correspond à une gastrite superficielle chronique ou non atrophique, qui persiste toute la vie si l'infection n'est pas traitée (1). Ce processus inflammatoire chronique peut conduire à une gastrite atrophique, qui peut évoluer en ulcère de l'estomac ou cancer gastrique, deux importantes pathologies du tractus gastro-intestinal supérieur (3-6). La présence des anticorps dirigés contre la souche CagA de *H. pylori* est liée au développement de la gastrite atrophique du corpus (7). Les preuves épidémiologiques indiquent un lien entre les adénocarcinomes gastriques, les lymphomes de la muqueuse associée au tissu lymphoïde (MALT) (8,9) et l'infection à *H. pylori*.

## 3. PRINCIPE DU TEST

Ce test ELISA des anticorps IgG *H. pylori* est basé sur la méthode immuno-enzymatique avec un antigène bactérien de *H. pylori* partiellement purifié, adsorbé sur une microplaque et un anticorps de détection marqué par la peroxydase de raifort (HRP).

Le test se déroule selon les réactions suivantes :

1. Un antigène bactérien partiellement purifié de *H. pylori* fixé sur la surface en polystyrène des puits, fixe les anticorps IgG anti-*H. pylori* présents dans l'échantillon.
2. Les puits de la microplaque sont lavés pour retirer l'excès d'échantillon.
3. Un anticorps monoclonal anti-IgG humaine conjugué à la HRP se fixe aux anticorps *H. pylori*.
4. Les puits sont lavés et le substrat TMB est ajouté. Le substrat est oxydé par la réaction enzymatique et donne un produit final coloré en bleu.
5. La réaction enzymatique est stoppée par la solution d'arrêt. Pour les échantillons positifs pour *H. pylori*, la solution dans les puits vire au jaune et les valeurs calculées sont > 30 UIE.

#### **4. MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS**

**A utiliser pour le diagnostic in vitro.**

**ATTENTION: Manipuler les échantillons de plasma et de sérums comme du matériel potentiellement nocif pour l'organisme.**

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement contaminés et traités comme s'ils étaient infectieux.

Veillez SVP vous reporter à la publication du Ministère Américain de la Santé et des Services Sociaux (Bethesda, MD., USA) concernant les mesures de sécurité en laboratoires médicaux et de microbiologie, 1999, 4ème éd. (CDC/NIH) et à la publication n° (CDC) 88-8395 ou à toute autre réglementation locale ou nationale concernant les procédures de sécurité en laboratoire pour différentes maladies

Nos coffrets contiennent des réactifs fabriqués à partir de composants du sang humain. Les matières premières concernées ont donné des résultats négatifs aux tests de recherche des anticorps de l'hépatite B et C et des anticorps anti-VIH. Cependant, étant donné qu'aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'absence de ces éléments pathogènes, toutes les précautions recommandées pour la manipulation des dérivés du sang doivent être respectées.

Utiliser toujours des gants de protection lors de la manipulation des échantillons de patient. Utiliser un dispositif de pipetage de sécurité. Ne jamais pipeter avec la bouche. Lire toutes les instructions avant d'effectuer

ce test. Tous les réactifs fournis dans ce kit peuvent être éliminés en les déversant dans l'évier et en rinçant excessivement avec l'eau du robinet.

## 5. PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

L'échantillon de sang est prélevé par ponction veineuse dans p.ex. un tube en plastique EDTA ou pour sérum. Les tubes de sang pour plasma sont mélangés immédiatement en les retournant 5-6 fois et les tubes pour sérum sont laissés (minimum 30 minutes) à température ambiante (20-25°C) pour la coagulation. Le plasma est séparé immédiatement, et le sérum après coagulation, par une centrifugation (p.ex. tube plastique: 2000g, 10-15 min). Le sérum ou plasma peut être conservé au réfrigérateur (2-8°C) pour une durée de trois jours. Pour une conservation longue, les échantillons doivent être conservés congelés (de préférence à -70°C, sinon à -20°C). Mélanger soigneusement les échantillons après décongélation. Eviter les cycles répétés de congélation et décongélation des échantillons. Ne pas utiliser les échantillons hémolysés, lipidiques ou troubles.

## 6. CONTENU DU COFFRET, PREPARATION DES REACTIFS ET STABILITE DU MATERIEL FOURNI

La quantité de réactif est suffisante pour 96 puits et trois essais séparés. Les réactifs de différents lots ne doivent pas être mélangés.

### 6.1. Microplaque (Microplate)

**Contenu:** 12 x 8 barrettes dans un cadre, recouvertes d'antigène bactérien de *H. pylori* partiellement purifié.

**Préparation:** Prêt à l'emploi.

**Stabilité:** Stable jusqu'à la date de péremption. Jeter les barrettes après utilisation.

### 6.2. Tampon de lavage concentré (Washing Buffer Concentrate) (10x)

**Contenu:** 120 mL de tampon phosphate (PBS) concentré x10 contenant du Tween 20 et un conservateur: 0,1% de ProClin 300.

**Préparation:** Diluer au 1:10 (par exemple 100 mL+ 900 mL) avec de l'eau distillée et bien mélanger.

**Stabilité:** La solution diluée est stable pendant deux semaines au (2-8°C).

### 6.3. Tampon de dilution (Diluent Buffer)

**Contenu:** 100 mL de tampon phosphate contenant une protéine de saturation, du tween 20, 0,1% de ProClin 300 comme conservateur et un colorant rouge.

**Préparation:** Prêt à l'emploi.

**Stabilité:** Jusqu'à la date de péremption.

### 6.4. Calibreur (Calibrator)

**Contenu:** Un flacon contenant 1,5 mL de sérum humain calibré en *H. pylori* IgG et 0.1% de ProClin 300 comme conservateur. La valeur en unités immuno-enzymatiques (UIE) du calibreur est indiquée sur l'étiquette du flacon.

**Préparation:** Prêt à l'emploi.

**Stabilité:** Jusqu'à la date de péremption.

### 6.5. Contrôle négatif (Negative Control)

**Contenu:** Un flacon contenant 1,5 mL de sérum de contrôle négatif en *H. pylori* IgG avec 0.1% de ProClin 300 comme conservateur : La valeur en unités immuno-enzymatiques (UIE) du sérum est indiquée sur l'étiquette du flacon.

**Préparation:** Prêt à l'emploi.

**Stabilité:** Jusqu'à la date de péremption.

### 6.6.6. Contrôle positif (Positive Control)

**Contenu:** Un flacon contenant 1,5 mL de sérum de contrôle positif en *H. pylori* IgG avec 0.1% de ProClin 300 comme conservateur : La valeur en unités immuno-enzymatiques (UIE) du sérum est indiquée sur l'étiquette du flacon.

**Préparation:** Prêt à l'emploi.

**Stabilité:** Jusqu'à la date de péremption.

### 6.7. Solution de conjugué (Conjugate Solution)

**Contenu:** 0.2 mL d'un anticorps monoclonal anti-IgG humaine, conjugué à la HRP et préparé dans un tampon de stabilisation contenant 0,02% de méthylisothiazolone, 0,02% de bromonitrodioxane et 0,002% d'autres isothiazolones actives comme conservateurs.

**Préparation:** Diluer au 1 :100 (p.ex. 40 µL + 3960 µL) avec le tampon de dilution.

**Stabilité:** Jusqu'à la date de péremption. Jeter l'excès de conjugué dilué après utilisation.

### **6.8. Solution de substrat ( Substrate Solution)**

**Contenu:** 15 mL de tétraméthylbenzidine (TMB) en solution aqueuse.

**Préparation:** Prêt à l'emploi

**Stabilité:** Jusqu'à la date de péremption. Eviter l'exposition directe à la lumière.

### **6.9. Solution d'arrêt (Stop Solution)**

**Contenu:** 15 mL d'acide sulfurique 0,1 mol/L.

**Préparation:** Prêt à l'emploi

**Stabilité:** Jusqu'à la date de péremption.

### **6.10. Films d'incubation**

4 feuilles de plastique pour couvrir la microplaque pendant l'incubation.

### **6.11. Manuel d'instruction**

## **7. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI**

- Eau distillée ou dé ionisée.
- Micropipettes et pointes jetables, pour distribuer avec précision 5 à 1000  $\mu$ L.
- Pipettes pour distribuer avec précision 1 à 10 mL.
- Pipette à 8 canaux pour distribuer 100  $\mu$ L.
- Eprouvette graduée, 1000 mL.
- Agitateur de type Vortex pour les dilutions d'échantillons.
- Tubes à essai pour diluer les échantillons.
- Laveur de microplaques.
- Serviettes en papier ou papier absorbant.
- Minuteur.
- Incubateur, 37°C.
- Lecteur microplaques, 450 nm.
- Tubes de prélèvement plastiques pour sérum ou plasma.
- Bac à glace.

## **8. CONSERVATION ET STABILITE**

Conserver tous les éléments du coffret au réfrigérateur (2-8°C). Dans ces conditions, ils sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette des différents réactifs ainsi que sur l'emballage. Ne pas congeler ou exposer les réactifs à des températures élevées, ne pas

les conserver à plus de 8°C en dehors de leur utilisation. La solution de substrat est sensible à la lumière. La plaque de microtitration ou les barrettes individuelles ne doivent pas être retirées de l'emballage aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante (20-25°C). Les barrettes non utilisées doivent être remises dans l'emballage qui sera soigneusement refermé et conservé au frais (2-8°C).

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Ne pas inter changer les réactifs de coffrets portant des numéros de lot différents et ne jamais les remplacer par des réactifs de coffrets fournis par d'autres fabricants. Utiliser uniquement de l'eau distillée ou dé ionisée. Les éléments du coffret sont fournis à des concentrations précises. Toute dilution supplémentaire ou autre modification des réactifs pourrait entraîner l'obtention de résultats incorrects.

### **Indications de l'altération du coffret**

Les composants liquides ne doivent pas être visiblement opalescents ou contenir des éléments précipités. Le tampon de lavage concentré, conservé entre 2 et 8°C, peut toutefois présenter des cristaux qui doivent se dissoudre après homogénéisation à température ambiante (20-25°C). La solution de substrat doit être incolore ou bleu pâle. Toute autre coloration indique une détérioration du substrat.

### **Conservation et stabilité des échantillons**

Une étude sur la conservation et la stabilité au cours de la congélation/décongélation montre qu'il n'y a pas de différence de stabilité entre des échantillons négatifs, dans la zone critique ou nettement positifs pour *H. pylori*. La stabilité des échantillons faiblement positifs n'a pas été évaluée.

## **9. MODE OPERATOIRE**

### **PREPARATIFS**

Amener tous les réactifs et la microplaque à température ambiante (20-25°C). Préchauffer l'incubateur à 37°C. Diluer le tampon de lavage concentré au 1:10 (100 mL + 900 mL) avec de l'eau distillée ou dé ionisée. **Lire toute la procédure du test avant de commencer. Il est recommandé de doser le calibre, les contrôles et les échantillons en double sur une même plaque. Le calibre et les contrôles doivent être utilisés à chaque test.**

Bien mélanger tous les réactifs avant usage.

#### ETAPE 1: DILUTION DES ECHANTILLONS

Mélanger les sérums et diluer au 1 :200 (5 µL + 995 µL) avec le tampon de dilution. **Bien mélanger.**

#### ETAPE 2: LES ECHANTILLONS

Homogénéiser et distribuer 100 µL de tampon de dilution (Blanc), de calibreur (CAL), de contrôle négatif (CN), positif (CP) et d'échantillons dilués (E1, E2, E3, etc.) dans les puits appropriés, en double (voir la figure 1). Recouvrir la plaque d'un film de plastique. Incuber pendant 30 min à 37°C. Remarque: Il est recommandé de distribuer les échantillons dans les puits en 10 min maximum pour éviter une dérive du test dans la plaque.

	1	2	3	4	5
A	Blanc	Blanc			
B	CAL	CAL			
C	CN	CN			
D	CP	CP			
E	E1	E1			
F	E2	E2			
G	E3	E3			
H	etc.	etc.			

**Figure 1. Plan de distribution**

#### ETAPE 3: LAVAGE

Laver les barrettes avec 3 x 350 µL de tampon de lavage dilué et taper légèrement, à plusieurs reprises, la plaque retournée sur une serviette de papier absorbant propre pour éliminer tout résidu de tampon de lavage.

#### ETAPE 4: SOLUTION DE CONJUGUE

Distribuer 100 µL de dilution mélangée (1 à 100) de solution diluée de conjugué dans les puits à l'aide d'une pipette à 8 canaux. Recouvrir la plaque d'un film d'incubation. Incuber pendant 30 min à 37°C.

#### ETAPE 5: LAVAGE

Laver les barrettes avec 3 x 350 µL de tampon de lavage dilué et taper légèrement, à plusieurs reprises, la plaque retournée sur une serviette de papier absorbant propre pour éliminer tout résidu de tampon de lavage.

## ETAPE 6: SUBSTRAT

Distribuer à l'aide d'une pipette à 8 canaux 100  $\mu$ L de la solution de substrat dans les puits vides. Déclencher le minuteur d'incubation après avoir distribué la solution de substrat dans la première barrette et laisser incuber pendant exactement 30 min. à température ambiante (20-25°C). Eviter l'exposition directe à la lumière durant l'incubation.

## ETAPE 7: L'ARRÊT DE REACTION

Distribuer, à l'aide d'une pipette à 8 canaux 100  $\mu$ L de la solution d'arrêt dans les puits.

## ETAPE 8: LES RESULTATS

Mesurer l'absorbance de chaque puits à 450 nm dans les 30 minutes.

## 10. RESULTATS

### 10.1. Valeur du contrôle qualité

1) Le calibreur et les contrôles inclus dans le coffret doivent être utilisés à chaque procédure de test. Des graphiques de contrôle de qualité devront être conservés pour suivre les performances des contrôles ou des méthodes statistiques appropriées devront être utilisées pour analyser la valeur du contrôle, qui doit être comprise dans l'intervalle de confiance approprié, établi par chaque laboratoire. La condition requise est que, selon les valeurs établies par chaque laboratoire, le contrôle positif soit positif et le contrôle négatif soit négatif. Les résultats obtenus pour les contrôles doivent correspondre à ceux attendus, pour pouvoir valider les résultats du test.

2) Le bon fonctionnement du test peut être vérifié en observant la valeur de l'absorbance du calibreur. La mesure d'absorbance du calibreur lue doit être  $> 1.000$ .

### 10.2. Calcul des résultats

Calculer la valeur d'absorbance moyenne (A) pour le calibreur, les contrôles et pour les échantillons de patients testés en double. Soustraire de ces valeurs moyennes calculées la valeur d'absorbance moyenne du blanc.

Calculer les unités immuno-enzymatiques (UIE) comme suit:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Sample}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrator}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})} \times 100 = \text{Sample EIU}$$

### 10.3. Interprétation des résultats

Négatif < 30 UIE

Positif ≥ 30 UIE

Une valeur négative inférieure à 30 UIE indique un résultat négatif ou qu'aucun anticorps *H. pylori* n'a été détecté ou que le taux d'anticorps était inférieur au seuil de détection. Une valeur de 30 UIE et plus indique que des anticorps *H. pylori* ont été détectés et que le résultat est dans ce cas positif. Les témoins de qualité, contrôles positif et négatif, fournis dans le kit doivent être utilisés à chaque expérimentation. Les résultats obtenus pour les contrôles doivent correspondre à ceux attendus pour accepter les résultats du test. L'ampleur de l'écart entre la valeur mesurée et la valeur de seuil, n'est pas indicative de la quantité totale d'anticorps présents. Ces valeurs de seuil ont été déterminées avec le coffret ELISA pour *H. pylori* de BIOHIT. Pour les patients dont les échantillons montrent des valeurs limites, il est recommandé d'utiliser une méthode alternative (p.ex. test respiratoire) ou bien de tester un second échantillon prélevé dans un délai raisonnable. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs attendues pour un état clinique où les valeurs d'anticorps IgG *H. pylori* utilisables pour le diagnostic. De même, les résultats d'IgG *H. pylori* déterminés pour un échantillon donné ou avec les tests de différents fabricants peuvent varier à cause de différences de spécificité de la méthode et des réactifs utilisés. Les résultats obtenus avec les tests d'autres fabricants ne sont pas interchangeables.

### 10.4. Valeurs attendues

La plupart des personnes exposées à *H. pylori* développe des anticorps IgG contre ce microorganisme (2,5,6). Les taux d'anticorps observés en fonction de l'âge sont similaires chez l'homme et la femme. La prévalence de l'infection à *H. pylori* est de 30-40% aux Etats Unis, au Canada et dans les pays d'Europe de l'Ouest, de 20% environ en Australie et de 70-90% dans les pays d'Europe de l'Est, en Afrique, Afrique du Sud et Asie. Beaucoup de patients qui ont un taux d'anticorps élevé sont

asymptomatiques, même s'ils sont infectés par *H. pylori*. Par conséquent le taux d'anticorps n'est pas nécessairement corrélé avec la sévérité des symptômes cliniques.

## **11. LIMITES DE LA PROCEDURE**

De même que pour toutes les procédures de diagnostic, les résultats obtenus avec le test ELISA pour *H. pylori* de Biohit, doivent être interprétés en corrélation avec les différents renseignements cliniques concernant le patient et toutes autres informations disponibles pour le médecin. Un test positif avec un taux d'anticorps élevé peut-être obtenu chez les patients récemment traités pour l'infection *H. pylori*.

## **12. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES**

### **Reproductibilité et imprécision**

#### Variation inter dosages

Un panel de dix (10) échantillons (un échantillon négatif, sept dans la zone critique, un positif et un fortement positif) a été utilisé pour déterminer la variation inter dosages. Les échantillons ont été mesurés en duplicata dans quarante (40) tests différents en 20 jours de travail.

Pour les échantillons de sérum, Le coefficient moyen de variation (%CV) se situait entre 4.2 et 7.0% et pour les échantillons EDTA entre 4.2 et 8.1%. Le %CV moyen pour les échantillons de sérum dans la zone critiques était de 6.3% (entre 5.4 – 7.0%) et pour les échantillons EDTA de 6.1% (entre 5.0 – 8.1%).

#### Variation intra dosages

Un panel de quatre (4) échantillons de sérum (un échantillon négatif, un en zone critique, un positif et un fortement positif) a été utilisé pour la détermination de la variation intra dosages. Les échantillons ont été mesurés en vingt-deux (22) échantillons simples en un test et la moyenne de trois (3) différents tests a été calculée.

Pour les échantillons de sérum, le coefficient moyen de variation (%CV) variait de 3.8 à 4.6% et pour les échantillons EDTA de 3.5 à 4.9%.

Lorsque comparés à la culture, le coffret ELISA IgG *Helicobacter pylori* a obtenu les performances suivantes :

N=523		Culture	
		Positif	Négatif
Diagnostic Biohit	Positif	166	9
	Négatif	7	341

Sensibilité clinique	96.5% (95%CI= 92.6 - 98.4%)
Spécificité clinique	96.0% (95%CI= 93.4 - 97.6%)

Lorsque comparés à l'histologie, le coffret ELISA IgG *Helicobacter pylori* a obtenu les performances suivantes :

N=187		Histologie	
		Positif	Négatif
Diagnostic Biohit	Positif	52	8
	Négatif	9	118

Corrélation positive	85.2%
Corrélation négative	93.7%

Le coffret ELISA IgG *Helicobacter pylori* de Biohit a été comparé à un autre produit commercial ELISA pour les anticorps *H. pylori* et il a obtenu les performances suivantes :

N=134		Commercial ELISA	
		Positif	Négatif
Diagnostic Biohit	Positif	32	1
	Négatif	3	98

Corrélation positive	91.4%
Corrélation négative	99.0%

### Corrélation (accord de pourcentage)

Le coffret ELISA IgG *Helicobacter pylori* de Biohit a été évalué en trois études avec 523, 187 et 134 échantillons prélevés chez des patients âgés de 20 à 89 ans.

## **Sensibilité analytique**

La sensibilité du test ELISA *H. pylori* IgG a été déterminée selon les directives NCCLS (CLIA) selon les exigences des Consensus Standards for Medical Testing (NCCLS EP17-A).

La limite de blanc (LoB) a été déterminée comme la 95ème centile sous laquelle tombent les résultats de la mesure de 60 échantillons de blanc (solution de blanc). La LoB a été trouvée comme étant égale à 1.1 EIU.

La limite de détection (LoD), qui est la plus petite quantité actuelle de substance à analyser qui peut être détectée avec 95% de confiance, a été déterminée en utilisant quatre échantillons de plasma EDTA et de sérum qui contiennent des niveaux d'anticorps proches de la valeur LoB observée. La LoD a été trouvée comme étant égale à 1.8 EIU pour les deux types d'échantillons de plasma EDTA et sérum.

La limite de quantification (LoQ), c.-à-d. la plus petite quantité de substance à analyser dans un échantillon qui peut être valablement détectée, a été calculée avec l'hypothèse d'un coefficient de variation (CV%) de 20% au niveau de la LoD. A cet effet, la LoQ a été calculée pour être  $1.2 \times \text{LoD} = 2.2$  EIU pour les deux échantillons de plasma EDTA et de sérum.

## **13. DATE DE PUBLICATION**

**Brochure du coffret ELISA IgG *Helicobacter pylori*.**

Version 01, 25.06.2009.

## **14. GARANTIE**

Le Fabricant devra remédier à tous les défauts découverts dans un produit (« produit défectueux ») qui résultent d'un composant inapproprié ou d'une fabrication défectueuse et qui, notamment mais pas limitées, empêchent le fonctionnement ou l'utilisation du produit, les fonctions conformes aux caractéristiques et spécificités établies par le Fabricant. CEPENDANT LA PRESENTE GARANTIE N'EST PAS APPLICABLE SI LE DEFAUT, ALTERANT OU MODIFIANT LE PRODUIT, A ETE CAUSE NOTAMMENT, PAR UNE UTILISATION IMPROPRE OU ABUSIVE DU PRODUIT, UN

DOMMAGE ACCIDENTEL, UNE CONSERVATION INCORRECTE DU PRODUIT OU ENCORE L'UTILISATION DU PRODUIT POUR DES OPERATIONS HORS DE LEURS LIMITATIONS SPECIFIEES OU HORS DE LEURS CARATERISTIQUES, CONTRAIRES AUX INSTRUCTIONS DONNEES DANS CE MODE D'EMPLOI.

La période de la présente garantie octroyée au Distributeur est définie dans la notice d'utilisation des Produits et prend effet à compter de la date où le produit relevant est envoyé par le Fabricant. En cas de litiges, c'est la version anglaise du texte qui s'applique.

Tous les coffrets de diagnostic Biohit ont été fabriqués selon nos protocoles de qualité conforme aux normes ISO 9001 / ISO 13485 et ont subi avec succès les procédures d'Assurance Qualité qui se rapportent à ces produits.

## 15. ABREGE DE LA PROCEDURE

Equilibrer tous les réactifs à température ambiante (20-25°C). Ne pas oublier de bien mélanger tous les réactifs et les échantillons avant de pipeter

\*

Après mélange, pipeter dans les puits 100 µL de solution de blanc, les calibres, le contrôle et les échantillons du patient dilués (1 à 200)

\*

**Incuber 30 min à 37°C**

\*

Laver 3 fois avec 350 µL de tampon de lavage dilué

\*

Pipeter 100 µL de solution diluée de conjugué (dilution au 1/100e) et homogénéiser dans les puits

\*

**Incuber 30 min à 37°C**

\*

Laver 3 fois avec 350 µL de tampon de lavage dilué

\*

Pipeter 100 µL de solution de substrat homogénéisée dans les puits

\*

**Incuber 30 min à température ambiante (20-25°C)**

\*

Pipeter 100 µL de solution d'arrêt homogénéisée dans les puits

\*

**Lire à 450 nm dans les 30 minutes**

## INSTRUCCIONES DE USO

*Helicobacter pylori* IgG ELISA

Cat. Nº. 601 040.02

## CONTENIDO

1. USO PREVISTO.....	77
2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN .....	77
3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	77
4. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	78
5. RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS .....	79
6. CONTENIDO DEL CONJUNTO, PREPARACIÓN DEL REACTIVO Y ESTABILIDAD DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS .....	79
6.1. Microplaca (Microplate).....	79
6.2. Concentrado de tampón de lavado (Washing Buffer Concentrate) (10x)	79
6.3. Tampón diluyente (Diluent Buffer).....	80
6.4. Calibrador (Calibrator).....	80
6.5. Control negativo (Negative Control).....	80
6.6. Control positivo (Positive Control).....	80
6.7. Solución conjugada (Conjugate Solution).....	80
6.8. Solución de sustrato (Substrate Solution).....	81
6.9. Solución de interrupción (Stop Solution).....	81
6.10. Cubiertas de incubación.....	81
6.11 Instrucciones de uso .....	81
7. MATERIALES NECESARIOS, PERO NO PROPORCIONADOS ..	81
8. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD.....	81
9. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA .....	82
10. RESULTADOS.....	84
10.1. Valores de control de calidad .....	84
10.2. Cálculo de los Resultados.....	84
10.3. Interpretación de los resultados .....	85
10.4. Valores esperados .....	85
11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO .....	86
12. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO .....	86
13. FECHA DE EMISIÓN .....	88
14. GARANTÍA .....	88
15. BREVE RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO .....	90

APÉNDICE: CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD

## 1. USO PREVISTO

La prueba ELISA para IgG contra *Helicobacter pylori* es un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos humanos de clase IgG contra *Helicobacter pylori* en EDTA o plasma tratado con heparina y en suero. La prueba tiene como objetivo ayudar en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes adultos con síntomas clínicos de gastritis. PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

## 2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* es la causa más importante de gastritis crónica. Otro mecanismo para la gastritis y la gastritis atrófica severa es el mecanismo autoinmune (1, 2). Este conjunto tiene como objetivo ayudar al diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

*Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa con forma espiral, que forma colonias en el estómago humano. El organismo se encuentra en la capa mucosa del estómago sobre el epitelio gástrico y parece no invadir el tejido. Sin embargo, la mucosa bajo el área de la colonización de *H. pylori* se inflama de forma invariable; esta condición se denomina gastritis crónica superficial o gastritis no atrófica, la cual puede persistir de por vida si no es tratada (1). Este proceso inflamatorio crónico puede llevar a una gastritis atrófica, la que ha sido relacionada con ulceración péptica y cáncer gástrico, dos de las enfermedades más importantes del tracto gastrointestinal superior (3-6). La presencia de anticuerpos contra cepas de CagA *H. pylori* ha sido vinculada con el desarrollo de gastritis atrófica en el cuerpo (7). La evidencia epidemiológica indica un vínculo entre el adenocarcinoma gástrico y el linfoma del tejido linfóide asociado a la mucosa (MALT) (8,9) y la infección por *H. Pylori*.

## 3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Esta prueba ELISA de anticuerpos IgG contra *H. pylori* se basa en una técnica de enzimoanálisis con antígeno bacteriano de *H. pylori* parcialmente purificado absorbido en una microplaca y un anticuerpo de detección marcado con peroxidasa de rábano (HRP).

El ensayo se realiza de acuerdo con las siguientes reacciones:

1. El antígeno bacterial de *H. pylori* parcialmente purificado conectado a la superficie de poliestireno de los pocillos se une a los anticuerpos IgG contra *H. pylori* presentes en la muestra.
2. Los pocillos se lavan para eliminar la muestra residual.
3. Una IgG antihumana monoclonal conjugada con HRP se une a los anticuerpos contra *H. pylori*.
4. Los pocillos se lavan y se agrega el sustrato TMB. La enzima oxigena el sustrato y se forma un producto final de color azul.
5. Se termina la reacción enzimática con la solución de interrupción. Las pruebas positivas de *H. pylori* se tornan de color amarillo con valores calculados de >30 EIU.

#### 4. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*.

**PRECAUCIÓN: Manipule las muestras de plasma y suero como materiales con riesgo biológico potencial.**

Todas las muestras deben ser consideradas potencialmente contaminadas y tratadas como si estuvieran infectadas. Consulte la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999, 4a ed. (CDC/NIH) y N° (CDC) 88-8395 del U. S. Department of Health and Human Services (Bethesda, MD., EE.UU.) sobre informes de procedimientos de seguridad en laboratorios ante diferentes enfermedades o cualquier otra regulación local o nacional sobre reportes de procedimientos de seguridad en laboratorios en caso de diferentes infecciones.

Este conjunto contiene reactivos fabricados a partir de componentes sanguíneos humanos. Los materiales de origen proporcionados en este conjunto han sido probados para detectar la presencia de anticuerpos contra la hepatitis B y C, como también de anticuerpos contra el VIH, y se determinó que eran negativos. Sin embargo, en vista de que ningún método de prueba puede ofrecer total certeza de que estos patógenos estén ausentes, se recomienda seguir todas las precauciones recomendadas para la manipulación de derivados de la sangre.

Use siempre guantes protectores cuando manipule muestras de pacientes.

Use un dispositivo para manipular las pipetas con seguridad. Nunca maneje las pipetas con la boca. Lea todas las instrucciones antes de realizar este análisis. Todos los reactivos del conjunto pueden ser eliminados vertiéndolos en un fregadero y dejando correr el agua.

## 5. RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

La muestra de sangre se toma por punción venosa, por ejemplo, en un tubo de plástico EDTA o en un tubo con suero. Los tubos de sangre se mezclan inmediatamente, volteándolos de arriba a abajo 5 a 6 veces, y los tubos para suero se dejan a temperatura ambiente (20 a 25 °C) para permitir que coagulen (durante al menos 30 minutos). Tras la coagulación, el suero y el plasma se separan de inmediato mediante centrifugación (por ejemplo, tubo de ensayo plástico, fuerza centrífuga relativa de hasta 2000 G, 10 a 15 minutos). El suero y el plasma se pueden almacenar refrigerados (2 a 8 °C) por tres días. Para una conservación prolongada, las muestras se deben almacenar congeladas (de preferencia a -70 °C o como alternativa, a -20 °C). Una vez descongeladas las muestras, mézclelas cuidadosamente. Evite el congelamiento y descongelamiento repetido de las muestras. No se deben utilizar muestras demasiado hemolizadas, lipémicas o turbias.

## 6. CONTENIDO DEL CONJUNTO, PREPARACIÓN DEL REACTIVO Y ESTABILIDAD DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS

Los reactivos son suficientes para 96 pocillos y para tres usos separados. Los reactivos de diferentes conjuntos no se deben mezclar.

### 6.1. Microplaca (Microplate)

**Contenido:** Tiras de 12 x 8 en trama recubiertas con antígeno bacterial de *H. pylori* parcialmente purificado.

**Preparación:** Lista para usar.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento. Elimine las tiras utilizadas.

### 6.2. Concentrado de tampón de lavado (Washing Buffer Concentrate) (10x)

**Contenido:** 120 mL de 10 x concentrado de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Tween 20 y 0,1% de ProClin 300 como preservante.

**Preparación:** Diluya a 1:10 (por ejemplo, 100 mL + 900 mL) con agua destilada y mezcle bien.

**Estabilidad:** La solución diluida es estable durante dos semanas en refrigeración (2 a 8 °C).

### **6.3. Tampón diluyente (Diluent Buffer)**

**Contenido:** 100 mL de tampón de fosfato que contiene proteína de bloqueo, Tween 20, 0,1% de ProClin 300 como preservante y extracto de tinte rojo.

**Preparación:** Lista para usar.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento.

### **6.4. Calibrador (Calibrator)**

**Contenido:** un frasco que contiene 1,5 mL de suero humano basado en el calibrador IgG contra *H. pylori* con 0,1% ProClin 300 como preservante. El valor EIU del calibrador está impreso en la etiqueta del frasco.

**Preparación:** Lista para usar.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento.

### **6.5. Control negativo (Negative Control)**

**Contenido:** Un frasco que contiene 1,5 mL de suero humano basado en control negativo IgG contra *H. pylori* con 0,1% ProClin 300 como preservante. El valor EIU del suero de control está impreso en la etiqueta del frasco.

**Preparación:** Lista para usar.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento.

### **6.6. Control positivo (Positive Control)**

**Contenido:** un frasco que contiene 1,5 mL de suero humano basado en control positivo de *H. pylori* con 0,1% ProClin 300 como preservante. El valor EIU del suero de control está impreso en la etiqueta del frasco.

**Preparación:** Lista para usar.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento.

### **6.7. Solución conjugada (Conjugate Solution)**

**Contenido:** 0,2 mL de IgG antihumano monoclonal conjugado con HRP en tampón estabilizador con un 0,02% de metilisotiazolona y un 0,02% de bromonitrodioxana y un 0,002% de otras isotiazolonas como preservantes.

**Preparación:** Diluir a 1:100 (por ejemplo, 40 µL + 3960 µL) con el tampón diluyente.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento. Elimine el exceso de solución conjugada diluida después del uso.

### 6.8. Solución de sustrato (Substrate Solution)

**Contenido:** 15 mL de tetrametilbenzidina (TMB) en solución acuosa.

**Preparación:** Lista para usar.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento. Evitar la exposición a la luz directa.

### 6.9. Solución de interrupción (Stop Solution)

**Contenido:** 15 mL de ácido sulfúrico a 0,1 mol/L.

**Preparación:** Lista para usar.

**Estabilidad:** Estable hasta la fecha de vencimiento.

### 6.10. Cubiertas de incubación

Cuatro láminas de plástico para cubrir la microplaca durante la incubación.

### 6.11. Instrucciones de uso

## 7. MATERIALES NECESARIOS, PERO NO PROPORCIONADOS

- Agua destilada o desionizada
- Micropipetas y boquillas desechables, para proporcionar con precisión 5 a -1000  $\mu$ L
- Pipetas para proporcionar con precisión 1 a 10 mL
- Pipeta de 8 canales que proporcione 100  $\mu$ L
- Probeta graduado, 1000 mL
- Mezclador Vortex para dilución de muestras
- Tubos de ensayo para dilución de muestras
- Lavador de microplacas
- Toallas de papel o papel absorbente
- Cronómetro
- Incubador, 37°C
- Lector de microplacas, 450 nm
- por ejemplo, tubo de ensayo plástico para recolectar la sangre para suero o plasma
- Contenedor para hielo

## 8. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conserve el conjunto IgG contra *Helicobacter pylori* refrigerado (2 a 8 °C). Cuando se conserva a estas temperaturas, el conjunto es estable hasta

la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta de la caja y en la etiqueta de cada componente del conjunto. No congele ni exponga el conjunto a altas temperaturas, ni conserve a más de 8 °C cuando no esté en uso. La solución de sustrato es sensible a la luz. La microplaca o tiras individuales no se deben retirar de la bolsa hasta que estén a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Las tiras no utilizadas se deben guardar en la bolsa, sellar y almacenar entre 2 a 8 °C.

No utilice reactivos después de la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta. No utilice reactivos de conjuntos con diferentes números de lote ni reactivos sustitutos de conjuntos de otros fabricantes. Utilice solamente agua destilada o deionizada. Los componentes del conjunto se proporcionan en concentraciones precisas. Diluciones posteriores u otras alteraciones de los reactivos pueden provocar resultados incorrectos.

### **Indicaciones de deterioro del conjunto**

Los componentes líquidos no deben estar visiblemente turbios ni contener material precipitado. Sin embargo, entre 2 a 8°C, el concentrado de tampón de lavado puede cristalizarse parcialmente, pero los cristales se disolverán mezclando a temperatura ambiente (20 a 25°C). La solución de sustrato debe ser incolora o azul claro. Cualquier otro color indica deterioro de la solución de sustrato.

### **Almacenamiento y estabilidad de las muestras**

Los resultados observados en el estudio de muestras almacenadas y descongeladas no mostraron diferencias de estabilidad en aquellas muestras que arrojaron resultados negativos, valores límite de *H. pylori* o que dieron valores positivos de la bacteria. No se evaluó la estabilidad de muestras de bajo valor positivo.

## **9. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

### **PREPARACIONES PRELIMINARES**

Permita que todos los reactivos y la microplaca alcancen la temperatura ambiente (20 a 25°C). Caliente el incubador hasta 37°C. Diluya el concentrado de tampón de lavado a 1:10 (por ejemplo, 100 mL + 900 mL) con agua destilada o deionizada. **Lea el procedimiento completo del análisis antes de comenzar. Se recomienda que el calibrador, los**

**controles y las muestras se apliquen en la placa como duplicados. Es necesario utilizar el calibrador y los controles en cada prueba realizada.**

Mezcle bien todos los reactivos antes de su uso.

#### PASO 1: DILUCIÓN DE LA MUESTRA

Diluya las muestras de suero o plasma a 1:200 (5  $\mu$ L + 995  $\mu$ L) con el tampón diluyente, **mezcle bien**.

#### PASO 2: LAS MUESTRAS

Mezcle y agregue 100  $\mu$ L del tampón diluyente (Blanco) con la pipeta, el calibrador (CAL), el control negativo (CN), el control positivo (CP) y las muestras diluidas (M1, M2, M3, etc.) en los pocillos como duplicados (ver figura 1). Cubra la placa con la cubierta de incubación. Incube durante 30 minutos a 37°C. Nota: se recomienda dispensar todas las muestras en los pocillos dentro de 10 minutos para evitar el desplazamiento del ensayo en la placa.

	1	2	3	4	5
A	Blanco	Blanco			
B	CAL	CAL			
C	CN	CN			
D	CP	CP			
E	M1	M1			
F	M2	M2			
G	M3	M3			
H	etc.	etc.			

**Figura 1. Orden de las pipetas.**

#### PASO 3: LAVADO

Lave las tiras con 3 x 350  $\mu$ L del tampón de lavado diluido y golpee suavemente la placa invertida un par de veces en una toalla de papel limpia.

#### PASO 4: CONJUGADA

Utilice una pipeta de 8 canales para agregar a los pocillos 100  $\mu$ L de la dilución mezclada de solución conjugada (1:100). Cubra la placa con la cubierta de incubación. Incube durante 30 minutos a 37 °C.

#### PASO 5: LAVADO

Lave las tiras con 3 x 350  $\mu$ L del tampón de lavado diluido y golpee suavemente

la placa invertida un par de veces en una toalla de papel limpia.

#### **PASO 6: SUSTRATO**

Utilice una pipeta de 8 canales para agregar a los pocillos 100  $\mu$ L de la solución de sustrato. Inicie el contador de incubación después de agregar con la pipeta la solución de sustrato en la primera tira y continúe la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Evite la exposición directa a la luz durante la incubación.

#### **PASO 7: SOLUCION DE INTERRUPCION**

Utilice una pipeta de 8 canales para agregar a los pocillos 100  $\mu$ L de la solución de interrupción.

#### **PASO 8: RESULTADOS**

Mida la absorción a 450 nm dentro de 30 minutos.

## **10. RESULTADOS**

### **10.1. Valores de control de calidad**

1) En todas las pruebas se deben utilizar el calibrador y los controles incluidos en el conjunto. Se recomienda llevar gráficos de control de calidad para seguir el desempeño de los controles o bien, utilizar métodos estadísticos apropiados para analizar los valores de control. Dichos valores deben estar entre los intervalos de confianza correspondientes utilizados en cada laboratorio. El requisito es que el control positivo sea positivo y el control negativo sea negativo, de acuerdo a los valores establecidos en cada laboratorio. Se deben obtener los resultados de control esperados, a fin de que éstos puedan ser aceptados.

2) El funcionamiento correcto de la prueba se puede verificar al observar la absorción del calibrador. La lectura de absorción del calibrador debe ser  $> 1.000$ .

### **10.2 Cálculo de los Resultados**

Calculate the mean absorbance (A) value for the calibrator, controls and patient samples assayed in duplicate. Subtract the blank value from the calculated mean absorbance values.

Calcule las unidades inmunoenzimáticas (EIU) de la siguiente forma:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Muestra}}) - \bar{X}(A_{\text{Blanco}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrador}}) - \bar{X}(A_{\text{Blanco}})} \times 100 = \text{Muestra EIU}$$

### 10.3 Interpretación de los resultados

Negativo < 30EIU

Positivo ≥ 30 EIU

Un valor menor a 30 EIU indica que es negativo o que no se detectaron anticuerpos *H. pylori* o que los anticuerpos se encuentran por debajo de un nivel detectable. Un valor de 30 EIU o más indica que se detectaron anticuerpos *H. pylori* y que por lo tanto el valor es positivo. Los controles con propósitos de calidad, negativos y positivos que se proporcionan con el conjunto se deben probar en cada ensayo. Para poder aceptar los resultados de la prueba se deben obtener los resultados esperados del control. La magnitud del resultado medido sobre el valor discriminante no indica la cantidad total presente del anticuerpo. Estos valores discriminantes han sido determinados utilizando el conjunto ELISA para IgG contra *Helicobacter pylori* de Biohit. A los pacientes cuyas muestras arrojan valores límite se debe recolectar una segunda muestra, si es posible, dentro de un período de tiempo razonable. Cada laboratorio debe establecer su propio rango de valores esperados para la situación clínica donde los valores de anticuerpos IgG contra *H. pylori* se utilicen para diagnósticos. Además, los resultados IgG contra *H. pylori* determinados para una muestra dada con análisis de diferentes fabricantes pueden variar debido a diferencias en los métodos de análisis y especificidad de los reactivos. Los resultados obtenidos utilizando métodos de análisis de otros fabricantes no deben usarse en forma intercambiable.

### 10.4. Valores esperados

La mayoría de las personas expuestas a *H. pylori* desarrollan anticuerpos IgG en el organismo (2,5,6) La relación entre la edad y la presencia de anticuerpos *H. pylori* es similar para hombres y mujeres. La prevalencia de la infección por *H. pylori* es de un 30-40% en los Estados Unidos, Canadá y Europa Occidental, casi un 20% en Australia y un 70-90% en Europa Oriental, África, Sudamérica y Asia. Muchos pacientes con niveles positivos de anticuerpos son asintomáticos, aunque estén infectados con

*H. pylori*. En conclusión, los niveles de anticuerpos no están necesariamente relacionados con la severidad de los síntomas clínicos.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Como cualquier procedimiento de diagnóstico, los resultados de ELISA para IgG contra *H. pylori* de Biohit se deben interpretar en conjunto con la presentación clínica del paciente y con cualquier otra información disponible para el médico. Un resultado positivo de número elevado de anticuerpos puede obtenerse en pacientes tratados recientemente contra infección por *H. pylori*.

## 12. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

### Reproducibilidad e imprecisión

#### Variación entre ensayos

Para la determinación de la variación entre ensayos se usó un panel de diez (10) muestras (una negativa, una en límite, una positiva y una muestra altamente positiva). Las muestras se midieron por duplicado en cuarenta (40) pruebas durante 20 días laborables.

Para muestras de suero el coeficiente medio de variación (%CV) varió de 4,2 a 7,0% y para muestras de EDTA de 4,2 a 8,1%. El %CV promedio para muestras límites de suero fue de 6,3% (variación entre 5,4 y 7,0%) y para muestras EDTA límites 6,1% (variación entre 5,0 y 8,1%).

#### Variación entre ensayos

Para la determinación de la variación entre ensayos se usó un panel de cuatro (4) muestras de suero (una negativa, una en límite, una positiva y una muestra altamente positiva). Las muestras se midieron en veintidós (22) muestras en una prueba y se calculó el promedio de tres (3) pruebas diferentes.

Para muestras de suero el coeficiente medio de variación (%CV) varió de 3,8 a 4,6% y para muestras de EDTA de 3,5 a 4,9%.

### Porcentaje de coincidencias

El conjunto ELISA para IgG contra *Helicobacter pylori* de Biohit se evaluó en tres estudios con muestras de 523, 187 y 134 pacientes de 20 a 89 años de edad.

Quando se comparó con la cultura, el conjunto ELISA para IgG contra *Helicobacter pylori* mostró el siguiente comportamiento:

N=523		Cultivo	
		Positivo	Negativo
Diagnóstico de Biohit	Positivo	166	9
	Negativo	7	341

Sensibilidad clínica	96.5% (95%CI=92.6 - 98.4%)
Especificidad clínica	96.0% (95%CI=93.4 - 97.6%)

Quando se comparó con la histología, el conjunto ELISA para IgG contra *Helicobacter pylori* mostró el siguiente comportamiento:

N=187		Histología/Endoscopia	
		Positivo	Negativo
Diagnóstico de Biohit	Positivo	52	8
	Negativo	9	118

Porcentaje de coincidencia positivo	82.5%
Porcentaje de coincidencia negativo	93.7%

La prueba del Biohit ELISA para IgG contra *Helicobacter pylori* fue comparada con otro ELISA para anticuerpos *H. pylori* y el siguiente comportamiento:

N=134		Comercial ELISA	
		Positivo	Negativo
Diagnóstico de Biohit	Positivo	32	1
	Negativo	3	98

Porcentaje de coincidencia positivo	91.4%
Porcentaje de coincidencia negativo	99.0%

### Sensibilidad analítica

La sensibilidad del ELISA *H. pylori* IgG se determinó de acuerdo con

las guías Consensus Standards for Medical Testing (NCCLS EP17-A) de NCCLS (CLIA).

El límite blanco (LoB) se determinó como el 95o porcentaje bajo el que se encuentran los resultados de las mediciones de 60 muestras vacías (solución blanca). El LoB se determinó como 1,1 EIU.

El límite de detección (LoD), el que es la cantidad real más baja de análisis que puede ser detectada con un 95% de seguridad, se estudió usando cuatro muestras de plasma y suero EDTA conteniendo anticuerpos en niveles cercanos al valor LoB observado. El LoD se determinó como 1,8 EIU para las muestras de plasma y suero.

El límite de cuantificación (LoQ), o sea la cantidad real más baja de análisis que puede ser detectada con seguridad, se calculó asumiendo un coeficiente de variación (CV%) de 20% al nivel de LoD. Así mismo, el LoQ se calculó como  $1,2 \times \text{LoD} = 2,2$  EIU para las muestras de plasma y suero.

### **13. FECHA DE EMISIÓN**

**Inserto del conjunto ELISA para IgG contra *Helicobacter pylori*.**

Version 01, 25.06.2009.

### **14. GARANTÍA**

El Fabricante debe reparar todo defecto descubierto en cualquier Producto (el "Producto defectuoso") que sea el resultado de materiales inadecuados o fabricación negligente y que impida el funcionamiento mecánico o el uso previsto para el Producto, lo cual incluye, pero no se limita a, las funciones indicadas en las especificaciones de los Productos del Fabricante. SIN EMBARGO, TODA GARANTÍA SERÁ CONSIDERADA NULA SI SE DETERMINA QUE EL PROBLEMA SE PRODUJO A CAUSA DE MALTRATO, USO INCORRECTO, DAÑO ACCIDENTAL, ALMACENAMIENTO INCORRECTO O UTILIZACIÓN DE PRODUCTOS PARA OPERACIÓN MÁS ALLÁ DE SUS LIMITACIONES ESPECIFICADAS O MÁS ALLÁ DE SUS ESPECIFICACIONES QUE CONTRAVENGAN LAS INSTRUCCIONES INDICADAS EN EL MANUAL DE INSTRUCCIONES.

El período de esta garantía para el Distribuidor se indica en el manual de instrucción de los Productos y comenzará a partir de la fecha correspondiente al envío del Producto por parte del Fabricante. En caso de conflicto con respecto a su interpretación, se aplicará el texto en inglés.

Todos los conjuntos de diagnóstico de Biohit han sido fabricados en conformidad con nuestros protocolos de gestión de calidad ISO 9001/ ISO 13485 y han pasado todos los procedimientos de Aseguramiento de la calidad correspondientes relacionados con estos productos.

## 15. BREVE RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

Permita que todos los reactivos alcance temperatura ambiente (20-25° C).  
Recuerde mezclar bien todos los reactivos y muestras antes de usar la pipetas

\*

Después de mezclar use pipetas para poner en los pocillos 100  $\mu$ L de solución blanca, el control y las muestras diluidas (1:200) de los pacientes

\*

Incube durante **30 minutos a 37°C**

\*

Lave lo pocillos 3 veces con 350  $\mu$ l de solución diluida de lavado

\*

Use las pipetas para agregar 100  $\mu$ L de la dilución (1:100) y mezcle la solución conjugada en los pocillos

\*

Incube durante **30 minutos a 37°C**

\*

Lave 3 veces con 350  $\mu$ L del tampón de lavado diluido

\*

Use las pipetas para poner 100  $\mu$ L de solución de sustrato en los pocillos

\*

Incubar por 30 min. a temperatura ambiente (**20-25° C**)

\*

Use las pipetas para poner 100  $\mu$ L de solución de interrupción en los pocillos

\*

**Lectura a 450 nm dentro de 30 minutos**

## ISTRUZIONI PER L'USO

*Helicobacter pylori* IgG ELISA

N. Cat. 601 040.02

## INDICE

1. APPLICAZIONE CLINICA.....	92
2. BREVE DESCRIZIONE.....	92
3. PRINCIPIO DEL TEST.....	92
4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	93
5. RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI.....	94
6. CONTENUTO DEL KIT, PREPARAZIONE DEI REAGENTI E STABILITA' DEI MATERIALI FORNITI.....	94
6.1. Micropiastra (Microplate).....	94
6.2. Concentrato di tampone di lavaggio (Washing Buffer Concentrate)(10x).....	94
6.3. Tampone di diluizione (Diluent Buffer).....	94
6.4. Calibratore (Calibrator).....	95
6.5. Controllo negativo (Negative Control).....	95
6.6. Controllo positivo (Positive Control).....	95
6.7. Soluzione coniugata (Conjugate Solution).....	95
6.8. Soluzione di substrato (Substrate Solution).....	95
6.9. Soluzione di arresto (Stop Solution).....	96
6.10. Copertura per incubazione.....	96
6.11. Istruzioni per l'uso.....	96
7. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI.....	96
8. CONSERVAZIONE E STABILITÀ.....	96
9. PROCEDURA DEL TEST.....	97
10. RISULTATI.....	99
10.1. Valori per il controllo della qualità.....	99
10.2. Calcolo dei risultati.....	99
10.3. Interpretazione dei risultati.....	99
10.4. Valori previsti.....	100
11. LIMITI DELLA PROCEDURA.....	100
12. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	101
13. DATA DI PUBBLICAZIONE.....	103
14. GARANZIA.....	103
15. BREVE ILLUSTRAZIONE DELLA PROCEDURA.....	104

APPENDICE: CERTIFICATO DI CONTROLLO DELLA QUALITA'

## 1. APPLICAZIONE CLINICA

Il test ELISA per le IgG dell'*Helicobacter pylori* è un dosaggio enzimatico immunoassorbente (ELISA) per la rilevazione qualitativa degli anticorpi IgG anti- *Helicobacter pylori* nell'uomo in EDTA o plasma e nel siero. Il test viene utilizzato per la diagnosi dell'infezione da *Helicobacter pylori* in pazienti adulti con sintomi clinici di gastrite. PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

## 2. BREVE DESCRIZIONE

Le infezioni da *Helicobacter pylori* sono la causa principale di gastrite cronica. Alla base di gastrite e gastrite atrofica grave vi può inoltre essere il meccanismo autoimmune che può anche essere attivato da un'infezione da *H. pylori* (1, 2). Questo kit viene impiegato per determinare una diagnosi di infezione da *H. pylori*.

L'*Helicobacter pylori* è un battere gram negativo a forma di spirale che vive in colonie nello stomaco umano. Questo organismo si trova nella mucosa gastrica sovrastante l'epitelio gastrico e non sembra invadere il tessuto. Tuttavia, la mucosa sottostante l'area della colonizzazione da parte dell'*H. pylori* è sempre infiammata; questa condizione viene definita gastrite non atrofica o gastrite superficiale cronica e, se non trattata, dura per tutta la vita (1). Questo processo infiammatorio cronico può portare alla gastrite atrofica, che è stata correlata all'ulcera peptica e al tumore gastrico, due importanti patologie del tratto gastrointestinale superiore (3-6). La presenza di anticorpi di ceppo *H.pylori* CagA è stata correlata allo sviluppo della gastrite atrofica nel corpo (7). Le prove epidemiologiche indicano un collegamento tra adenocarcinoma gastrico, linfoma del tessuto linfoide associato alle mucose (MALT) (8,9) e infezione da *H. pylori*.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

Questo test ELISA per gli anticorpi IgG di *H. pylori* è basato su una tecnica di immunodosaggio enzimatico con antigene batterico *H. pylori* parzialmente purificato su una micropiastra e un anticorpo di rilevazione marcato con perossidasi di rafano (HRP).

Il dosaggio include le seguenti reazioni:

1. Un antigene batterico *H. pylori* parzialmente purificato fissato alla superficie in polistirene dei pozzetti lega gli anticorpi IgG *H. pylori* presenti nel campione.
2. I pozzetti vengono lavati per rimuovere il campione residuo.
3. L'IgG anti-umana monoclonale coniugata a perossidasi di rafano (HRP) si lega agli anticorpi *H. pylori*.
4. I pozzetti vengono lavati e viene aggiunto il substrato di TMB. Il substrato viene ossidato dall'enzima, generando un prodotto finale di colore blu.
5. La reazione dell'enzima viene terminata con una soluzione di arresto. I campioni positivi per *H. pylori* diventano gialli con valori calcolati >30 EIU.

#### **4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

**Per l'uso diagnostico *in vitro*.**

**ATTENZIONE: I campioni di siero e di plasma sono materiali a rischio biologico.**

Tutti i campioni devono essere considerati come potenzialmente contaminati e devono essere trattati come se fossero infetti. Fare riferimento alla pubblicazione dell' U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, MD., USA) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999, 4° ed. (CDC/NIH) e N. (CDC) 88-8395 per quanto riguarda le procedure di sicurezza di laboratorio relativamente alle diverse malattie o alle normative locali o nazionali.

Il kit contiene reagenti emoderivati. Le materie prime fornite nel kit sono state testate in modo da escludere la presenza di anticorpi dell'epatite B e C, nonché di anticorpi anti-HIV. Tuttavia, poiché nessun metodo di verifica può offrire la certezza assoluta dell'assenza di questi patogeni, è necessario osservare tutte le precauzioni previste per la manipolazione di emoderivati.

Utilizzare sempre guanti protettivi per la manipolazione dei campioni dei pazienti. Utilizzare un dispositivo di pipettamento sicuro per tutte le operazioni di pipettamento. Non eseguire mai le operazioni di pipettamento a bocca. Prima di eseguire il test, leggere tutte le istruzioni. Per lo smaltimento di tutti i reagenti inclusi nel kit, versare il materiale in un lavandino con abbondante acqua corrente.

## 5. RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Il campione deve essere raccolto tramite puntura venosa, ad esempio in una provetta per EDTA o in una provetta per siero. Le provette dei campioni devono essere miscelate immediatamente capovolgendole per 5-6 volte; le provette di siero devono essere lasciate coagulare (per un minimo di 30 minuti) a temperatura ambiente (20...25 °C). Il siero viene separato dopo la coagulazione, e il plasma viene separato immediatamente tramite centrifugazione (ad esempio provetta di plastica, forza centrifuga relativa fino a 2000 G, 10-15 minuti). Il plasma e il siero possono essere conservati in frigorifero (2-8°C) per tre giorni. Per poter conservare i campioni più a lungo, si consiglia di congelarli (preferibilmente a -70°C, in alternativa a -20°C). Dopo averli scongelati, miscelare con attenzione i campioni. Evitare di congelare e scongelare i campioni più volte. I campioni torbidi, lipemici o emolizzati in modo grossolano non devono essere utilizzati.

## 6. CONTENUTO DEL KIT, PREPARAZIONE DEI REAGENTI E STABILITÀ DEI MATERIALI FORNITI

I reagenti sono sufficienti per 96 pozzetti e per tre sedute separate. Non miscelare mai reagenti di lotti di kit diversi.

### 6.1. Micropiastra (Microplate)

**Contenuto:** 12 x 8 strisce con telaio, ricoperte con antigene batterico *H. pylori* parzialmente purificato.

**Preparazione:** Pronta per l'uso.

**Stabilità:** Stabile fino alla data di scadenza. Dopo l'uso, gettare le strisce.

### 6.2. Concentrato di tampone di lavaggio (Washing Buffer Concentrate) (10x)

**Contenuto:** 120 mL di 10 x di concentrato di tampone di fosfato (PBS) contenente Tween 20 e 0,1% ProClin 300 come conservanti.

**Preparazione:** Diluire con acqua distillata 1 a 10 (ad esempio 100 mL + 900 mL) e miscelare bene.

**Stabilità:** La soluzione diluita è stabile per due settimane se conservata in frigorifero (2...8°C).

### 6.3. Tampone di diluizione (Diluent Buffer)

**Contenuto:** 100 mL di tampone di fosfato contenente proteine bloccanti, Tween 20, 0,1% ProClin 300 come conservanti ed estratto di colorante rosso.

**Preparazione:** Pronta per l'uso.

**Stabilità:** Stabile fino alla data di scadenza.

#### **6.4. Calibratore (Calibrator)**

**Contenuto:** un flacone contenente 1,5 mL di calibratore IgG *H. pylori* basato su siero umano con 0,1% ProClin 300 come conservanti. Il valore delle unità immuno enzimatiche (EIU) del calibratore è stampato sull'etichetta del flacone.

**Preparazione:** Pronta per l'uso.

**Stabilità:** Stabile fino alla data di scadenza.

#### **6.5. Controllo negativo (Negative Control)**

**Contenuto:** Un flacone contenente 1,5 mL di controllo negativo IgG *H. pylori* basato su siero umano con 0,1% ProClin 300 come conservanti. Il valore delle unità immuno enzimatiche (EIU) del siero di controllo è stampato sull'etichetta del flacone.

**Preparazione:** Pronta per l'uso.

**Stabilità:** Stabile fino alla data di scadenza.

#### **6.6. Controllo positivo (Positive Control)**

**Contenuto:** Un flacone contenente 1,5 mL di controllo positivo *H. pylori* basato su siero umano con 0,1% ProClin 300 come conservanti. Il valore delle unità immuno enzimatiche (EIU) del siero di controllo è stampato sull'etichetta del flacone.

**Preparazione:** Pronta per l'uso.

**Stabilità:** Stabile fino alla data di scadenza.

#### **6.7. Soluzione coniugata (Conjugate Solution)**

**Contenuto:** 0,2 mL di IgG anti-umana monoclonale coniugata con HRP in tampone stabilizzatore con 0,02% metil isotiazolone, 0,02% bromonitrodiossano e altro 0,002% isotiazolone attivo come conservanti.

**Preparazione:** Diluire con il tampone di diluizione 1 a 100 (ad esempio 40 µL + 3960 µL).

**Stabilità:** stabile fino alla data di scadenza. Dopo l'uso, gettare la soluzione di coniugato diluito in eccesso.

#### **6.8. Soluzione di substrato (Substrate Solution)**

**Contenuto:** 15 mL di tetrametilbenzidina (TMB) in soluzione acquosa.

**Preparazione:** Pronta per l'uso.

**Stabilità:** Stabile fino alla data di scadenza. Non esporre alla luce diretta.

### 6.9. Soluzione di arresto (Stop Solution)

**Contenuto:** 15 mL di acido solforico 0,1 mol/L.

**Preparazione:** Pronta per l'uso.

**Stabilità:** Stabile fino alla data di scadenza.

### 6.10. Copertura per incubazione

Quattro fogli di plastica per ricoprire la micropiastro durante l'incubazione.

### 6.11. Istruzioni per l'uso

## 7. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- ▶ Acqua distillata o deionizzata
- ▶ Micropipette e punte monouso, per l'erogazione accurata di 5 -1000  $\mu$ L
- ▶ Pipette per l'erogazione accurata di 1-10 mL
- ▶ Pipette a 8 canali per l'erogazione di 100 100  $\mu$ L
- ▶ Cilindro graduato, 1000 mL
- ▶ Miscelatore vortex per la diluizione dei campioni
- ▶ Provette per la diluizione dei campioni
- ▶ Dispositivo di lavaggio per micropiastre
- ▶ Salviette di carta o carta assorbente
- ▶ Timer
- ▶ Incubatore, 37°C
- ▶ Lettore per micropiastre, 450 nm
- ▶ ad esempio provetta per la raccolta di sangue in plastica per siero o plasma
- ▶ Contenitore per il ghiaccio

## 8. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Il kit *Helicobacter pylori* IgG deve essere conservato in frigorifero (2...8 °C). Se conservato a queste temperature, il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione e sull'etichetta di ogni componente del kit. Non congelare e non esporre il kit a temperature elevate. Non conservare a temperature superiori a 8 °C quando non in uso. La soluzione di substrato è sensibile alla luce. Non rimuovere la micropiastro né le singole strisce dalla confezione in alluminio prima che abbiano raggiunto la temperatura ambiente (20...25 °C). Le strisce non utilizzate devono essere riposte nella confezione in alluminio, sigillate e

conservate a 2...8 °C.

Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta. Non utilizzare reagenti di kit con numeri di lotto diverso e non utilizzare reagenti di kit di altri produttori. Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata. I componenti del kit sono forniti con concentrazioni precise. Un'ulteriore diluizione o altre alterazioni dei reagenti possono portare a risultati errati.

### **Indicazione del deterioramento del kit**

I componenti liquidi non devono essere visibilmente torbidi e non devono contenere precipitazioni. A 2...8 °C, il concentrato del tampone di lavaggio può cristallizzarsi, anche se parzialmente, ma i cristalli si dissolvono tramite miscelazione a temperatura ambiente (20...25°C). La soluzione di substrato deve essere incolore o di colore blu pallido. Qualsiasi altro colore indica un deterioramento della soluzione di substrato.

### **Conservazione e stabilità dei campioni**

I risultati dello studio sulla conservazione, sul congelamento e sullo scongelamento non hanno mostrato differenze nella stabilità dei campioni che restituiscono valori negativi per *H. pylori*, valori limite o valori chiaramente positivi per *H. pylori*. La stabilità di campioni a bassa positività non è stata valutata.

## **9. PROCEDURA DEL TEST**

### **OPERAZIONI PRELIMINARI**

Attendere che tutti i reagenti e la micropiastra raggiungano la temperatura ambiente (20...25°C). Riscaldare l'incubatore a 37 °C. Diluire il concentrato del tampone di lavaggio 1 a 10 (ad esempio 100 mL + 900 mL) con acqua distillata o deionizzata. **Leggere la procedura del test per intero prima di iniziare. Si consiglia di applicare sulla piastra come duplicati il calibratore, i controlli e i campioni. È necessario utilizzare il calibratore e i controlli in tutte le sedute del test.**

Miscelare bene tutti i reagenti prima dell'uso.

### **FASE 1: DILUIZIONE DEI CAMPIONI**

Diluire i campioni di plasma o siero miscelati 1 a 200 (5 µL + 995 µL) con il tampone di diluente. **Miscelare bene.**

## FASE 2: CAMPIONI

Miscelare e pipettare 100  $\mu\text{L}$  del tampone di diluizione (Iner.), il calibratore (CAL), il controllo negativo (CN), il controllo positivo (CP) e i campioni diluiti (S1, S2, S3, eccetera) nei pozzetti come duplicati (vedere la Figura 1). Coprire la piastra con la copertura per incubazione. Incubare per 30 minuti a 37°C. Nota: si consiglia di dispensare i campioni nei pozzetti entro 10 minuti per evitare una deriva del dosaggio nella piastra.

	1	2	3	4	5
A	Iner	Iner			
B	CAL	CAL			
C	CN	CN			
D	CP	CP			
E	S1	S1			
F	S2	S2			
G	S3	S3			
H	ecc.	ecc.			

**Figura 1. Ordine di pipettamento.**

## FASE 3: LAVAGGIO

Lavare le strisce con 3 x 350  $\mu\text{L}$  di tampone di lavaggio diluito e battere delicatamente la piastra capovolta alcune volte su una salvietta di carta pulita per rimuovere eventuali residui del tampone di lavaggio.

## FASE 4: CONIUGATA

Pipettare 100  $\mu\text{L}$  della soluzione coniugata diluita (1 a 100) miscelata nei pozzetti con una pipetta a 8 canali. Coprire la piastra con la copertura per incubazione. Incubare per 30 minuti a 37°C.

## FASE 5: LAVAGGIO

Lavare le strisce con 3 x 350  $\mu\text{L}$  di tampone di lavaggio diluito e battere delicatamente la piastra capovolta alcune volte su una salvietta di carta pulita per rimuovere eventuali residui del tampone di lavaggio.

**FASE 6: SUBSTRATO** Pipettare 100  $\mu\text{L}$  della soluzione di substrato nei pozzetti con una pipetta a 8 canali. Avviare il timer di incubazione dopo aver pipettato la soluzione di substrato nella prima striscia e continuare l'incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente (20...25°C). Non esporre alla luce diretta durante l'incubazione.

## FASE 7: SOLUZIONE DI ARRESTO

Pipettare 100  $\mu\text{L}$  della soluzione di arresto nei pozzetti con una pipetta a 8 canali.

## FASE 8: RISULTATI

Misurare l'assorbanza a 450 nm entro 30 minuti.

### 10. RISULTATI

#### 10.1. Valori per il controllo della qualità

1) Il calibratore e i controlli forniti con il kit devono essere utilizzati in tutte le sedute del test. È necessario registrare tabelle di controllo della qualità per monitorare le prestazioni dei controlli oppure utilizzare metodi statistici appropriati per analizzare i valori di controllo, che devono rientrare negli intervalli di confidenza appropriati utilizzati in ogni laboratorio. Il requisito è che il controllo positivo deve essere positivo e il controllo negativo deve essere negativo in base ai valori stabiliti in laboratorio. Per l'accettazione dei risultati del test, è necessario ottenere i risultati di controllo previsti.

2) Il corretto funzionamento del test può essere verificato osservando il valore di assorbanza del calibratore. Tale valore deve essere > 1.000.

#### 10.2. Calcolo dei risultati

Calcolare il valore di assorbanza medio (A) di calibratore, controlli e campioni paziente, con dosaggio in duplicato. Sottrarre il valore inerte dai valori di assorbanza media calcolati.

Calcolare le unità immuno enzimatiche (EIU) come segue:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Camp.}}) - \bar{X}(A_{\text{Iner.}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrat.}}) - \bar{X}(A_{\text{Iner.}})} \times 100 = \text{Campioni EIU}$$

#### 10.3. Interpretazione dei risultati

Negativo < 30 EIU

Positivo ≥ 30 EIU

Un valore inferiore a 30 EIU indica un risultato negativo, o che non sono stati rilevati anticorpi anti-*H. pylori*, oppure che gli anticorpi sono al di sotto del livello di rilevazione. Un valore uguale a 30 EIU o superiore indica che sono stati rilevati anticorpi anti-*H. pylori*, e quindi il risultato è positivo. Per motivi qualitativi, i controlli negativi e positivi forniti con il

kit devono essere verificati in ogni test. Per l'accettazione dei risultati del test, è necessario ottenere i risultati di controllo previsti. Il livello del risultato misurato al di sopra del valore di cut-off non è indicativo della quantità totale degli anticorpi presenti. I valori di cut-off sono stati determinati utilizzando il kit Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA. Dai pazienti i cui campioni restituiscono valori vicini al limite bisognerebbe raccogliere un secondo campione, se possibile, in tempi ragionevolmente rapidi. Ogni laboratorio deve stabilire un intervallo di valori attesi per le situazioni cliniche in cui i valori di anticorpi IgG *H. pylori* sono utilizzati per la diagnosi. Anche i risultati IgG *H.pylori* determinati per un determinato campione con dosaggi di diversi produttori possono variare, a causa delle differenze dei metodi di dosaggio e della specificità dei reagenti. I risultati ottenuti con metodi di dosaggio di altri produttori non devono essere utilizzati in modo interscambiabile.

#### **10.4. Valori previsti**

La maggior parte degli individui che entrano in contatto con l'*H. pylori* sviluppa gli anticorpi IgG al batterio (2,5,6). La presenza degli anticorpi anti-*H. pylori* in funzione dell'età è simile sia negli uomini che nelle donne. La prevalenza dell'infezione da *H. pylori* è pari al 30-40% negli U.S.A., in Canada e in Europa occidentale, a circa il 20% in Australia e al 70-90% in Europa orientale, Africa, Sud America e Asia. Molti pazienti che hanno livelli positivi di anticorpi sono asintomatici, anche se sono colonizzati dall'*H. pylori*. Quindi, i livelli di anticorpi non sono necessariamente correlati alla gravità dei sintomi clinici.

#### **11. LIMITI DELLA PROCEDURA**

Come con qualsiasi procedura diagnostica, i risultati del test Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA devono essere interpretati alla luce del quadro clinico del paziente, insieme a tutte le altre informazioni a disposizione del medico. In pazienti con infezione da *H. pylori* sottoposti a recente trattamento, è possibile ottenere un test positivo per elevata presenza di anticorpi.

## **12. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

### **Riproducibilità e precisione**

#### **Variazioni inter-saggio**

Per la determinazione di variazioni inter-saggio è stato impiegato un pannello costituito da dieci (10) campioni (uno negativo, sette positivi al limite, uno positivo e uno altamente positivo). I campioni sono stati misurati in duplicati in quaranta (40) sedute diverse durante 20 giorni lavorativi.

Nei campioni di siero il coefficiente medio di variazione (%CV) era compreso tra 4,2 e 7,0%, nei campioni di EDTA tra 4.2 e 8.1%. Il CV% medio per i campioni di siero positivi al limite era 6.3% (percentuale tra 5.4 e 7,0%); per i campioni di EDTA positivi al limite era 6.1% (percentuale tra 5,0 e 8,1%).

Il valore medio % di CV per i campioni di siero negativo era pari al 5.3% (fascia da 5.1 a 5.5%), per campioni di siero al limite al 5.7% (fascia dal 4.7 al 6.5%) e per campioni positivi di siero all'8.0% (fascia da 5.2 all'11.2%).

#### **Variazioni intra-saggio**

Per la determinazione di variazioni intra-saggio è stato impiegato un pannello costituito da quattro (4) campioni (uno negativo, uno positivi al limite, uno positivo e uno altamente positivo). I campioni sono stati misurati in ventidue (22) campioni singoli in una seduta ed è stata calcolata una media da tre (3) sedute diverse.

Nei campioni di siero il coefficiente medio di variazione (%CV) era compreso tra 3.8 e 4.6%, nei campioni di EDTA tra 3,5 e 4.9%.

### **Corrispondenza percentuale**

Il test ELISA Biohit per le IgG dell'*Helicobacter pylori* è stato valutato in 3 studi con 523, 187 e 134 campioni da pazienti di età compresa tra i 20 e gli 89 anni.

**Nel confronto con la coltura, il test ELISA per le IgG dell'*Helicobacter pylori* ha mostrato le seguenti prestazioni:**

N=523		Coltura	
		Positivo	Negativo
<b>Biohit Diagnostics</b>	Positivo	166	9
	Negativo	7	341

Sensibilità clinica	96.5% (95%CI=92.6 - 98.4%)
Specificità clinica	96.0% (95%CL=93.4 - 97.6%)

**Nel confronto istologico, il test ELISA per le IgG dell'*Helicobacter pylori* ha mostrato le seguenti prestazioni:**

N=187		Istologia/Endoscopia	
		Positivo	Negativo
<b>Biohit Diagnostics</b>	Positivo	52	8
	Negativo	9	118

Corrispondenza positiva percentuale	85.2%
Corrispondenza negativa percentuale	93.7%

**Il test Biohit *Helicobacter pylori* IgG ELISA è stato messo a confronto con un altro test ELISA commerciale per anticorpi *H. pylori*. Il confronto ha mostrato le seguenti prestazioni:**

N=134		Commercial ELISA	
		Positivo	Negativo
<b>Biohit Diagnostics</b>	Positivo	32	1
	Negativo	3	98

Corrispondenza positiva percentuale	91.4%
Corrispondenza negativa percentuale	99.0%

### **Sensibilità analitica**

La sensibilità del test ELISA per le IgG dell'*Helicobacter pylori* è stata determinata sulla base della direttiva NCCLS (CLIA) Consensus Standards for Medical Testing (NCCLS EP17-A – Standard di Consenso per Test Medici).

### **13. DATA DI PUBBLICAZIONE**

**Istruzioni d'uso per il kit ELISA per IgG *Helicobacter pylori*.**

Version 01, 25.06.2009.

### **14. GARANZIA**

Il Produttore è tenuto a porre rimedio a tutti i difetti scoperti in qualsiasi Prodotto ("Prodotto difettoso") causati dall'uso di materiali non adeguati o da errori di lavorazione che impediscano il funzionamento meccanico o l'uso previsto dei Prodotti, tra cui, ma non in modo limitativo, le funzioni indicate nelle specifiche sui Prodotti fornite dal Produttore. **QUALSIASI GARANZIA VERRÀ TUTTAVIA RITENUTA NULLA SE I DIFETTI SONO STATI CAUSATI DA ABUSO, USO ERRATO, DANNI ACCIDENTALI, CONSERVAZIONE O UTILIZZO ERRATO DEI PRODOTTI IN OPERAZIONI CHE ESULANO DAI LIMITI O DALLE SPECIFICHE INDICATE, IN MODO NON CONFORME ALLE INDICAZIONI FORNITE NEL MANUALE DI ISTRUZIONI.**

Il periodo di garanzia per il Distributore è definito nel manuale di istruzioni dei Prodotti e ha inizio dalla data in cui il Prodotto rilevante viene inviato dal Produttore. In caso di controversie interpretative si applica il testo in lingua inglese.

Tutti i kit diagnostici Biohit sono stati prodotti in conformità con i nostri protocolli di gestione della qualità ISO 9001 / ISO 13485 e hanno superato tutte le procedure di controllo della qualità rilevanti relative a questi prodotti.

## 15. BREVE ILLUSTRAZIONE DELLA PROCEDURA

Attendere che tutti i reagenti abbiano raggiunto la temperatura ambiente (20-25°C).

Ricordate di miscelare bene tutti i reagenti e di campioni appena prima del pipettamento.

\*

Dopo aver miscelato, pipettare 100 µL della soluzione inerte, i calibratori e i campioni diluiti (1 a 100) dei pazineti nei pozzetti

\*

Incubare per **30 minuti a 37°C**

\*

Lavare i pozzetti per 3 volte con 350 µL del tampone di lavaggio diluito

\*

Pipettare 100 µL della soluzione coniugata diluita (diluizione 1 a 100) e miscelata nei pozzetti

\*

Incubare per **30 minuti a 37°C**

\*

Lavare i pozzetti per 3 volte con 350 µL del tampone di lavaggio diluito

\*

Pipettare 100 µL della soluzione di substrato miscelata nei pozzetti

\*

Incubare per **30 min** a temperatura ambiente (**20-25°C**)

\*

Pipettare 100 µL della soluzione di arresto miscelata nei pozzetti

\*

Eeguire la **lettura** a 450 **entro 30 minuti**

## ИНСТРУКЦИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

ИФА на IgG к *Helicobacter pylori*

Кат. № 601 040.02

## СОДЕРЖАНИЕ

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ .....	106
2. РЕЗЮМЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ .....	106
3. ПРИНЦИП ТЕСТА .....	106
4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	107
5. ЗАБОР ОБРАЗЦОВ. ПРАВИЛА ОБРАЩЕНИЯ С ОБРАЗЦАМИ	108
6. СОСТАВ НАБОРА И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТА.	
СТАБИЛЬНОСТЬ МАТЕРИАЛОВ, ВХОДЯЩИХ В ПОСТАВКУ.....	108
6.1. Микропланшет (Microplate) .....	109
6.2. Концентрат промывочного буфера (Washing Buffer Concentrate) (10x)	109
6.3. Буфер для разведения (Diluent Buffer) .....	109
6.4. Калибратор (Calibrator) .....	109
6.5. Отрицательный контроль (Negative Control) .....	109
6.6. Положительный контроль (Positive Control) .....	110
6.7. Раствор конъюгата (Conjugate Solution).....	110
6.8. Раствор субстрата (Substrate Solution) .....	110
6.9. Останавливающий раствор (Stop Solution) .....	110
6.10. Крышка для инкубации .....	110
6.11. Инструкции по использованию .....	110
7. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ .....	111
8. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ .....	111
9. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА .....	112
10. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	114
10.1. Контроль качества исследования .....	114
10.2. Расчет результатов.....	114
10.3. Интерпретация результатов.....	115
10.4. Expected Values .....	115
11. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ.....	116
12. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	116
13. ДАТА ПУБЛИКАЦИИ .....	118
14. ГАРАНТИЯ .....	118
15. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРОЦЕДУРЫ .....	120

ПРИЛОЖЕНИЕ: СЕРТИФИКАТ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

## 1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система для ИФА на IgG к *Helicobacter pylori* – это система для иммуноферментного анализа, позволяющего провести качественное определение человеческих антител класса IgG к *Helicobacter pylori* в сыворотке или плазме с ЭДТА. Этот тест предназначен для диагностики инфекции, вызываемой *Helicobacter pylori*, у взрослых пациентов с клиническими симптомами гастрита. ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.

## 2. РЕЗЮМЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Инфекция, вызываемая *Helicobacter pylori*, является наиболее важной причиной развития хронического гастрита. Другим возможным механизмом развития гастрита, в том числе тяжелого атрофического гастрита, является аутоиммунный механизм (1,2). Эта тест-система предназначена для диагностики инфекции, вызываемой *H. pylori*.

*Helicobacter pylori* – это спиралевидная грамотрицательная бактерия, которая колонизирует слизистую оболочку желудка человека. Этот микроорганизм обнаруживается в слое слизи, покрывающим эпителиальные клетки желудка. Инвазия в ткани для него не характерна. Тем не менее, слизистая оболочка в зоне колонизации *H. pylori* всегда воспаляется; это состояние слизистой оболочки называется хроническим поверхностным, или неатрофическим, гастритом, который в отсутствие лечения персистирует в течение всей жизни (1). Хронический воспалительный процесс может приводить к развитию атрофического гастрита и связанных с ним состояний: пептической язвы и рака желудка - двум наиболее значимым заболеваниям верхнего отдела желудочно-кишечного тракта (3-6). Наличие антител к штаммам *H. pylori* CagA связывают с развитием атрофического гастрита тела желудка (7). Эпидемиологические доказательства указывают на наличие связи инфекции, вызываемой *H. pylori*, и аденокарциномы, а также MALT-лимфомы желудка (8,9).

## 3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Определение антител класса IgG к *H. pylori* основано на методе

иммуноферментного анализа (ИФА) с частично очищенным бактериальным антигеном *H.pylori*, адсорбированным на лунках микропланшета, и детекторными антителами, мечеными пероксидазой хрена (HRP).

Процедура исследования представляет собой следующую последовательность реакций:

1. Частично очищенный антиген *H. pylori*, закрепленный на полистироловой поверхности лунок, связывает антитела класса IgG к *H. pylori*, присутствующие в сыворотке крови человека.
2. Лунки микропланшета промываются для удаления остатков образцов сыворотки.
3. Моноклональные античеловеческие антитела (анти-IgG), конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), связываются с антителами к *H.pylori*.
4. Лунки повторно промываются; вносится субстрат (ТМБ). Субстрат окисляется ферментом до получения окрашенного в голубой цвет конечного продукта.
5. Ферментативная реакция прекращается после внесения останавливающего раствора. Образцы, содержащие IgG к *H. pylori*, приобретают желтый цвет. Это соответствует расчетному значению EIU > 30.

#### 4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для диагностики *in vitro*.

**ВНИМАНИЕ:** Обращайтесь образцами сыворотки и плазмы как с биологически опасным материалом.

Все образцы должны считаться потенциально инфицированными, поэтому с ними следует обращаться соответствующим образом. Пожалуйста, по этому вопросу обращайтесь к публикациям Департамента здоровья и медицинского обслуживания США (Вифезда, Мэриленд, США) по биологической безопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, 1999 г., 4-ое издание (CDC/NIH), № (CDC) 88-8395 для получения информации по безопасности лабораторных процедур при различных заболеваниях, или к любой аналогичной местной или национальной программе.

Эта тест-система содержат реагенты, изготовленные из компонентов крови человека. Образцы всех проб крови, из которых были изготовлены эти реагенты, были исследованы на наличие антител к вирусам гепатита В и С, а так же к ВИЧ. Все исследования дали отрицательный результат. Тем не менее, поскольку ни один из методов исследования не дает абсолютной гарантии отсутствия этих патогенов, необходимо соблюдать все рекомендуемые меры предосторожности обращения с дериватами крови.

При работе с образцами всегда используйте перчатки. Используйте безопасные приспособления для пипетирования материала. Никогда не пипетируйте ртом. Перед проведением экспресс-теста ознакомьтесь с инструкцией пользователя. Утилизируйте отработанные реагенты путем сливания в раковину и смывания большим количеством водопроводной воды.

## **5. ЗАБОР ОБРАЗЦОВ. ПРАВИЛА ОБРАЩЕНИЯ С ОБРАЗЦАМИ**

Образцы крови забираются из вены в пластиковую пробирку с ЭДТА или сывороткой. Пробирки для забора плазмы сразу же перемешиваются путем переворачивания 5-6 раз. Пробирки для забора сыворотки выдерживаются при комнатной температуре (20-25°C) в течение как минимум 30 минут для образования сгустка. После образования сгустка происходит отделение сыворотки, а плазма отделяется сразу же после забора путем центрифугирования (пластиковая пробирка, относительная центрифужная сила до 2000 г, время центрифугирования 10-15 минут). Плазма/сыворотка может храниться при температуре 2-8°C в течение 3-х дней. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить (предпочтительно при -70°C, или при -20°C). После размораживания необходимо тщательно перемешать образцы. Не допускайте повторного замораживания и размораживания. Не следует исследовать образцы с интенсивным гемолизом или помутнением, а также хилезные образцы.

## **6. СОСТАВ НАБОРА И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТА, СТАБИЛЬНОСТЬ МАТЕРИАЛОВ, ВХОДЯЩИХ В ПОСТАВКУ**

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок. Не следует смешивать

реагенты из различных серий наборов.

### **6.1. Микропланшет (Microplate)**

**Состав:** 12 по 8 стрипов в рамке с адсорбированным частично очищенным бактериальным антигеном *H. pylori*.

**Подготовка:** Готов к использованию.

**Стабильность:** Стабилен до окончания срока годности. Утилизируйте стрипы после использования..

### **6.2. Концентрат промывочного буфера (Washing Buffer Concentrate) (10x)**

**Состав:** 120 мл 10-кратного концентрата фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего Tween 20 и 0,1% ProClin 300 в качестве консерванта.

**Подготовка:** Развести 1:10 (т.е. 100 мл + 900 мл) дистиллированной водой и тщательно перемешать.

**Стабильность:** Рабочий раствор промывающего буфера стабилен 2 недели при температуре 2-8°C.

### **6.3. Буфер для разведения (Diluent Buffer)**

**Состав:** 100 мл фосфатного буфера, содержащего блокирующий белок, Tween 20, 0,1% ProClin 300 в качестве консерванта и краситель красного цвета.

**Подготовка:** Готов к использованию.

**Стабильность:** Стабилен до окончания срока годности.

### **6.4. Калибратор (Calibrator)**

**Состав:** Один флакон, содержащий 1,5 мл калибратора человеческого сывороточного IgG к *H. pylori* с 0,1% ProClin 300 в качестве консерванта. Значение калибратора в EIU (в иммуноферментных единицах) указано на этикетке флакона.

**Подготовка:** Готов к использованию.

**Стабильность:** Стабилен до окончания срока годности.

### **6.5. Отрицательный контроль (Negative Control)**

**Состав:** Один флакон, содержащий 1,5 мл отрицательного контроля человеческого сывороточного IgG к *H. pylori* с 0,1% ProClin 300 в качестве консерванта. Значение калибратора в EIU указано на этикетке флакона.

**Подготовка:** Готов к использованию.

**Стабильность:** Стабилен до окончания срока годности.

#### **6.6. Положительный контроль (Positive Control)**

**Состав:** Один флакон, содержащий 1,5 мл положительного контроля человеческого сывороточного IgG к *H. pylori* с 0,1% ProClin 300 в качестве консерванта. Значение калибратора в EIU указано на этикетке флакона.

**Подготовка:** Готов к использованию.

**Стабильность:** Стабилен до окончания срока годности.

#### **6.7. Раствор конъюгата (Conjugate Solution)**

**Состав:** 0,2 мл моноклональных античеловеческих антител анти-IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена, в стабилизирующем буфере с 0,02% метилизотиазолона, 0,02% бромонитродиоксиана и 0,002% других активных изотиазолонов в качестве консервантов.

**Подготовка:** Развести 1 к 100 (т.е. 40 мкл + 3960 мкл) разводящим буфером.

**Stability:** Стабилен до окончания срока годности.

#### **6.8. Раствор субстрата (Substrate Solution)**

**Состав:** 15 мл тетрометилбензидина (ТМБ) в водном растворе.

**Подготовка:** Готов к использованию.

**Stability:** Стабилен до истечения срока годности. Избегайте воздействия прямого солнечного света.

#### **6.9. Останавливающий раствор (Stop Solution)**

**Состав:** 15 мл 0,1 М серной кислоты.

**Подготовка:** Готов к использованию.

**Стабильность:** Стабилен до окончания срока годности.

#### **6.10. Крышка для инкубации**

4 листа пластиковых листа для накрывания лунок микропланшета во время инкубации.

#### **6.11. Инструкции по использованию**

## 7. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

- ▶ Дистиллированная или деионизированная вода
- ▶ Микропипетки и наконечники с объемами дозирования 5-1000 мкл
- ▶ Пипетки объемом 1 – 10 мл
- ▶ 8-канальный дозатор-пипетка с объемом дозирования 100 мкл
- ▶ Мерный цилиндр на 1000 мл
- ▶ Лабораторный вращающийся миксер для разведения образцов
- ▶ Пробирки для разведения
- ▶ Промыватель микропланшета
- ▶ Фильтровальная бумага
- ▶ Таймер
- ▶ Инкубатор, 37°C
- ▶ Микропланшетный ридер со светофильтром 450 нм
- ▶ Пластиковые пробирки для сыворотки или плазмы
- ▶ Контейнер для льда

## 8. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

СХранить набор для определения IgG к *Helicobacter pylori* необходимо при температуре 2...8 °С. В случае хранения при этой температуре набор стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке коробки набора и на этикетках пакетов с тестовыми пластинами. Не замораживайте и не подвергайте набор действию высокой температуры, не храните при температуре выше 8°C. Раствор субстрата чувствителен к свету. Микропланшет или отдельные стрипы не следует вынимать из пластиковой упаковки до того, как они нагреются до комнатной температуры (20-25°C). Неиспользованные стрипы необходимо поместить обратно в пластиковую упаковку, герметично закрыть и хранить при температуре 2-8°C.

Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке. Не используйте реагенты из наборов с другими серийными номерами или реагенты из наборов других производителей. Используйте только дистиллированную или деионизированную воду. Компоненты набора имеют определенную концентрацию. Дальнейшее разведение или другие повреждения

реагентов могут привести к получению некорректных результатов.

### **Определение непригодности набора**

Жидкие компоненты не должны быть мутными или содержать осадок. При температуре 2-8°C концентрат промывочного буфера может частично кристаллизоваться, однако эти кристаллы растворяются при перемешивании при комнатной температуре (20-25°C). Раствор субстрата должен быть бесцветными или бледно-голубого цвета. Другие цвета раствора указывают на непригодность раствора субстрата.

### **Хранение и стабильность образцов**

Результаты исследования различных условий хранения и замораживания-размораживания образцов показали, что различий в стабильности положительных, отрицательных или пограничных образцов нет. Стабильность слабо-положительных образцов не оценивалась.

## **9. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА**

### **ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ**

Все реагенты и микропланшет следует согреть до комнатной температуры (20-25°C). Нагрейте инкубатор до 37°C. Разведите концентрат промывочного буфера 1:10 дистиллированной или деионизированной водой (т.е. 100 мл + 900 мл). **Перед началом работы ознакомьтесь с порядком проведения исследования. Рекомендуется наносить калибратор, контроли и образцы на планшет в двойном экземпляре. Калибратор и контроли необходимо использовать в каждой серии анализов.**

Аккуратно перемешайте все реагенты перед началом работы.

### **ЭТАП 1: РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

Образцы сыворотки/плазмы разводят буфером для разведения 1:200 (5 мкл + 995 мкл) и **тщательно перемешивают.**

### **ЭТАП 2: ОБРАЗЦОВ**

Введите в лунки микропланшета в двойном экземпляре по 100 мкл буфера для разведения (Blank), калибратора (CAL), отрицательного

контроля (NC), положительного контроля (PC) и разведенных образцов (S1, S2, S3 и т.д.) (См. Рисунок 1). Закройте лунки крышкой и инкубируйте 30 мин при температуре 37°C. Примечание: рекомендуется вводить образцы в лунки с интервалом в 10 минут во избежание путаницы.

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	Blank	Blank			
<b>B</b>	CAL	CAL			
<b>C</b>	NC	NC			
<b>D</b>	PC	PC			
<b>E</b>	S1	S1			
<b>F</b>	S2	S2			
<b>G</b>	S3	S3			
<b>H</b>	Т.д.	Т.д.			

**Рисунок 1. Порядок введения растворов.**

#### ЭТАП 3: ПРОМЫВКА

Каждую лунку микропланшета промойте 3 раза 350 мкл рабочего раствора промывочного буфера. Для удаления остаточной жидкости переверните микропланшет и осторожно промокните его фильтровальной бумагой.

#### ЭТАП 4: КОНЬЮГАТА

С помощью 8-канального дозатора введите в лунки микропланшета по 100 мкл перемешанного разведенного (1:100) раствора конъюгата. Закройте лунки крышкой и инкубируйте 30 мин при температуре 37°C.

#### ЭТАП 5: ПРОМЫВКА

Каждую лунку микропланшета промойте 3 раза 350 мкл рабочего раствора промывочного буфера. Для удаления остаточной жидкости переверните микропланшет и осторожно промокните его фильтровальной бумагой.

#### ЭТАП 6: СУБСТРАТА

С помощью 8-канального дозатора введите в лунки микропланшета по 100 мкл раствора субстрата. С момента внесения реагента в первый стрип запустите таймер. Инкубируйте 30 мин при комнатной температуре (20-25°C). Не допускайте попадания прямого солнечного света.

## ЭТАП 7: ОСТАНАВЛИВАЮЩИЙ РАСТВОР

С помощью 8-канального дозатора введите в лунки микропланшета по 100 мкл останавливающего раствора.

## ЭТАП 8: РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм в течение 30 минут.

## 10. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 10.1 Контроль качества исследования

1) При постановке каждой серии анализа должны использоваться калибратор и контроли, входящие в состав набора. Для анализа контрольных значений используются диаграммы или статистические методы. Полученные значения должны укладываться в доверительные интервалы, принятые в данной лаборатории. Необходимо, чтобы положительный контроль давал положительные результаты, а отрицательный – отрицательные, в соответствии со значениями интервалов, принятых в данной лаборатории. Это необходимо для адекватности результатов теста.

2) Правильность постановки теста может быть подтверждена изучением значений оптической плотности калибратора. Оптическая плотность калибратора должна составлять > 1,000.

### 10.2 Расчет результатов

Рассчитайте среднее значение оптической плотности (A) каждой пары калибраторов, контролей и образцов. Отнимите среднее значение оптической плотности буфера для разведения от средних рассчитанных значений оптической плотности.

Рассчитайте количество иммуноферментных единиц (EIU) по формуле:

$$\frac{\bar{X}(A_{\text{Sample}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})}{\bar{X}(A_{\text{Calibrator}}) - \bar{X}(A_{\text{Blank}})} \times 100 = \text{Sample EIU}$$

### 10.3 Интерпретация результатов

Отрицательный < 30 EIU

Положительный ≥ 30 EIU

Значения EIU менее 30 указывают на отрицательный результат, т.е. говорят о том, что антител к *H. pylori* не определяется, или их количество ниже границы определения. Значения EIU, равные или большие 30, указывают на то, что антитела к *H. pylori* определяются, поэтому результат теста считается положительным. Для обеспечения качества результатов при проведении каждой серии анализов необходимо исследовать положительный и отрицательный контроли, входящие в состав каждого набора. Результаты контрольных анализов должны соответствовать ожидаемым значениям. Это необходимо для адекватности результатов теста. Величина отклонения измеренного результата от пограничного значения не свидетельствует об общем количестве антител в плазме/сыворотке. Пограничные значения были установлены с использованием набора реагентов для определения антител класса IgG к *Helicobacter pylori* (ИФА) компании Biohit. У пациентов, чьи результаты были пограничными, через определенный промежуток времени по возможности следует забрать повторный образец. Каждая лаборатория, в которой выполняется определение антител к *H. pylori*, должна установить свой диапазон ожидаемых значений для конкретной клинической ситуации. Кроме того, результаты определения антител наборами разных производителей по одному образцу могут существенно отличаться, вследствие использования разных методик исследования и специфичности реагентов. Результаты, полученные при использовании других методов анализа с помощью наборов других производителей, не являются эквивалентными результатам данного метода.

### 10.4 Ожидаемые значения

У большинства людей, зараженных *H. pylori*, образуются антитела класса IgG к данному микроорганизму (2, 5, 6). Возрастные показатели встречаемости антител к *H. pylori* одинаковы для обоих полов. Распространенность инфекции *H. pylori* в США, Канаде и Западной Европе составляет 30-40%, в Австралии – около 20%, в Восточной Европе, Южной Америке и Азии – 70-90%. У многих пациентов с наличием антител и с колонизацией слизистой желудка *H. pylori* симптомов заболевания не определяется. Поэтому уровень антител не обязательно коррелирует с тяжестью клинических симптомов.

## 11. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Как в случае многих диагностических процедур, результаты ИФА на IgG к *Helicobacter pylori* компании Biohit должны интерпретироваться с учетом клиники заболевания и любой другой информации, находящейся в распоряжении врача. Положительный тест на наличие антител может быть получен у пациентов, которые недавно излечились от инфекции, вызываемой *H. pylori*.

## 12. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Воспроизводимость и неточность

Вариации различных методов анализа

Набор из 10 (десять) различных образцов (один положительный, 7 пограничных, один отрицательный и один сильно-положительный образцы) использовался для определения вариаций между различными методами анализа. Образцы исследовались в двойном экземпляре в 40 (сорока) различных сериях анализов в течение 20 дней.

Для образцов сыворотки средний коэффициент вариаций (%CV) находился в диапазоне от 4,2 до 7,0%, а для образцов плазмы с ЭДТА – в диапазоне от 4,2 до 8,1%. Среднее значение %CV для образцов сыворотки с пограничными результатами составило 6,3% (диапазон: 5,4 – 7,0%), а для образцов плазмы с ЭДТА с пограничными результатами – 6,1% (диапазон: 5,0 – 8,1%).

Вариации данного метода анализа

Набор из 4 (четырёх) образцов сыворотки (один отрицательный, один пограничный, один положительный и один сильно-положительный образец) использовался для определения вариаций данного метода анализа. Образцы исследовались по 22 (двадцать два) раза в одной серии анализов. Всего было проведено 3 (три) серии анализов. Было рассчитано среднее значение результатов всех анализов.

Для образцов сыворотки средний коэффициент вариаций (%CV) находился в диапазоне от 3,8 до 4,6%, а для образцов плазмы с ЭДТА – в диапазоне от 3,5 до 4,9%.

### Процент совпадений

Тест-система для ИФА на IgG к *H. pylori* компании Biohit была оценена в трех исследованиях, в которых было изучено 523, 187 и 134 образцов от пациентов в возрасте от 20 до 89 лет.

По сравнению с культуральным методом, тест-система для ИФА на IgG к *H. pylori* продемонстрировала следующий результат:

N=523		Culture	
		Положительный	Отрицательный
Biohit Diagnostics	Положительный	166	9
	Отрицательный	7	341

Clinical Sensitivity	96.5% (95%CI= 92.6 - 98.4%)
Clinical Specificity	96.0% (95%CI= 93.4 - 97.6%)

По сравнению с гистологическим исследованием, тест-система для ИФА на IgG к *H. pylori* продемонстрировала следующий результат:

N=187		Histology	
		Положительный	Отрицательный
Biohit Diagnostics	Положительный	52	8
	Отрицательный	9	118

Percent Positive Agreement	85.2%
Percent Negative Agreement	93.7%

Было проведено сравнение тест-системы для ИФА на IgG к *H. pylori* компании Biohit с другой коммерческой тест-системой для ИФА на антитела к *H. pylori*. Исследование показало следующий результат:

N=134		Commercial ELISA	
		Положительный	Отрицательный
Biohit Diagnostics	Положительный	32	1
	Отрицательный	3	98

Percent Positive Agreement	91.4%
Percent Negative Agreement	99.0%

### **Аналитическая чувствительность**

Чувствительность ИФА на IgG к *H. pylori* определялась в соответствии с рекомендациями Соглашения о стандартах медицинских тестов (NCCLS EP17-A).

Граница отсутствия (LoB) определена как 95-ая перцентиль результатов исследования 60 образцов без антител (чистый раствор для разведения). Значение LoB составило 1,1 EIU.

Граница определения (LoD), которая представляет собой наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть определено с 95-процентными доверительным интервалом, была определена с помощью четырех образцов плазмы с ЭДТА и сыворотки, содержащих количества антител, близких к LoB. Значение LoD составило 1,8 EIU для образцов плазмы с ЭДТА и сыворотки.

Граница количественного определения (LoQ), т.е. наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть надежно определено, была определена допущением вариации LoD на величину CV% (20%). В соответствии с этим, расчетное значение LoQ составило  $1,2 \times \text{LoD} = 2,2$  EIU для образцов плазмы с ЭДТА и сыворотки.

## **13. ДАТА ПУБЛИКАЦИИ**

**Вкладыш в набор для ИФА на IgG к *Helicobacter pylori*.**

Version 01, 25.06.2009.

## **14. ГАРАНТИЯ**

Производитель обязуется устранить за свой счет все дефекты любого Продукта («Продукт с дефектом»), возникшие в результате дефекта материалов или некачественного заводского изготовления и препятствующие функционированию или использованию этого Продукта по назначению, включая предназначение, указанное в спецификации изготовителя к Продукту, но не ограничиваясь

им. ЛЮБЫЕ ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА СЧИТАЮТСЯ НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫМИ, ЕСЛИ ДЕФЕКТЫ ЯВЛЯЮТСЯ СЛЕДСТВИЕМ НЕПРАВИЛЬНОГО ОБРАЩЕНИЯ, ИСПОЛЬЗОВАНИЯ, СЛУЧАЙНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ, НЕПРАВИЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ИЛИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТА ВНЕ УКАЗАННЫХ ОГРАНИЧЕНИЙ ИЛИ НЕ ПО СПЕЦИФИКАЦИИ И РЕКОМЕНДАЦИЯМ, ПРИВЕДЕННЫМ В ИНСТРУКЦИИ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ.

Гарантийный срок для дистрибьюторов установлен в инструкции пользователя и начинается с момента отгрузки Продукта производителем. В случае споров об интерпретации следует принимать во внимание текст инструкции на английском языке.

Все диагностические наборы компании Biohit произведены в соответствии с протоколами управления качеством ISO 9001/ISO 13485 и прошли все необходимые мероприятия по гарантии качества для этой продукции.

## 15. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРОЦЕДУРЫ

Согрейте все реагенты до комнатной температуры (20-25°C)  
Помните, что все реагенты и образцы непосредственно перед пипетированием следует тщательно перемешать

\*

После перемешивания в помощью пипетки на 100 мкл введите пустой раствор, калибраторы, контроли и разведенного 1:200 образцы пациентов в лунки

\*

**Инкубируйте 30 минут при температуре 37°C**

\*

3 раза промойте лунки 350 мкл разведенного промывочного буфера

\*

С помощью пипетки введите 100 мкл разведенного 1:100 и перемешанного раствора конъюгата в лунки

\*

**Инкубируйте 30 минут при температуре 37°C**

\*

3 раза промойте лунки 350 мкл разведенного промывочного буфера

\*

С помощью пипетки введите 100 мкл раствора субстрата в лунки

\*

**Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-25°C)**

\*

С помощью пипетки введите 100 мкл перемешанного останавливающего раствора в лунки

\*

**Считайте** оптическую плотность на длине волны 450 нм **в течение 30 минут**

REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR /  
QUELLENANGABEN / REFERENCES / REFERENCIAS /  
RIFERIMENTI / ССЫЛКИ

1. Varis K, Sipponen P. Gastritis. In: Principles and Practice of Gastroenterology and Hepatology. Gitnick G (ed.). Appleton & Lange, Connecticut, 1994; 85-197.
2. Sipponen P. *Helicobacter pylori* gastritis-epidemiology. J Gastroenterol 1997; 32:273-277.
3. Sipponen P, Marshall BJ. Gastritis and gastric cancer. Western countries. Gastroenterol Clin North Am 2000; 29:579-592.
4. Wadström T. An update on *Helicobacter pylori* Current Opinion in Gastroenterology 1995; 11:69-75.
5. Northfield TC, Mendall M, Goggin PC. *Helicobacter pylori* Infection, Pathophysiology, Epidemiology and Management. Kluwer Academic Press; Dordrecht: 1994.
6. Sipponen P. Update on the Pathologic Approach to the Diagnosis of Gastritis, Gastric Atrophy, and *Helicobacter pylori* and its sequelae. J Clin Gastroenterol 2001; 32:96-202.
7. Sande N, Nikulin M, Nilson I, Wadström T, Laxen F, Härkönen M, Suovaniemi O, Sipponen P, Increased Risk of Developing Atrophic Gastritis in Patients Infected with CagA+ *Helicobacter pylori*. Scand. J Gastroenterol 2001; 36:928-933.
8. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991; 325:1127-1131.
9. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelmann JH, Friedman GD. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 1994; 330:1267-1271.

**ORDERING INFORMATION / TILAUS INFORMAATIO /  
BESTÄLLNINGSGENOMGÅNGNING / BESTELLINFORMATION/  
INFORMATION CONCERNANT LA COMMANDE /  
INFORMACIÓN DE PEDIDOS / INFORMAZIONI PER LE  
ORDINAZIONI / ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

***Helicobacter pylori* IgG ELISA kit**

Cat. No. 601 040.02.

Headquarters / Pääkonttori / Huvudkontor / Hauptsitz / Siège principal/  
Oficina principal / Sede centrale / Головные офисы  
BIOHIT OYJ

Laippatie 1

00880 Helsinki, Finland

Tel: +358-9-773 861

Fax: +358-9-773 86200

E-mail: [info@biohit.com](mailto:info@biohit.com)

[www.biohit.com](http://www.biohit.com)

**CHINA**

Biohit Biotech (Suzhou) Co. Ltd.

Tel: +86-21-6248 5589

Fax: +86-21-6248 7786

E-mail: [info.china@biohit.com](mailto:info.china@biohit.com)

**FRANCE**

Biohit SAS

Tel: +33-1-3088 4130

Fax: +33-1-3088 4102

E-mail: [commercial.france@biohit.com](mailto:commercial.france@biohit.com)

**GERMANY**

Biohit Deutschland GmbH

Tel: +49-6003-828 20

Fax: +49-6003-828 222

E-mail: [info@biohit.de](mailto:info@biohit.de)

**JAPAN**

Biohit Japan Co., Ltd.

Tel: +81-3-5822 0021

Fax: +81-3-5822 0022

E-mail: [sales@biohit.co.jp](mailto:sales@biohit.co.jp)

RUSSIA

Biohit OOO Saint Petersburg

Tel: +7-812-327 5327

Fax: +7-812-327 5323

E-mail: main@biohit.ru

Biohit OOO, Moscow Office

Tel: +7-495-614 9550

Fax: +7-495-613 5577

Email: taras.pravdoljubenko@biohit.ru

U. K.

Biohit Healthcare Limited

Unit 1 Barton Hill Way

Torquay, Devon TQ2 8JG

Tel. +44-1803 315 900

Fax: +44-1803 315 530

E-mail: info@biohit.co.uk

U. S. A.

Biohit. Inc.

Tel: +1-732-922-4900

Fax: +1-732-922-0557

E-mail: diagnostics.usa@biohit.com

NOTES:

NOTES:

NOTES:

NOTES:

