



virion\serion



virion\serion

YOUR  
GLOBAL  
PARTNER  
IN  
DIAGNOSTICS

SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

**Manufacturer**  
**Fabricante**  
**Κατασκευαστής**  
**Fabricante**  
**Výrobce**

Institut Virion\Serion GmbH

Friedrich-Bergius-Ring 19  
D - 97076 Würzburg, Germany  
Telefon: +49 (0) 9 31 / 30 45 0  
Fax: +49 (0) 9 31 / 30 45 100

E-Mail: [dialog@virion-serion.de](mailto:dialog@virion-serion.de)  
Internet: [www.virion-serion.de](http://www.virion-serion.de)



Instructions - English  
Instrucciones de empleo - Español  
Οδηγίες χρήσης - Ελληνικά  
Instruções de emprego - Português  
Pokyny - Český

(Version/Versión/Έκδοση/Versão/Verze 13.11/12-1)

# Updates

Please pay attention to the differences in comparison to the previous version.

<b><u>Current version Nr.:</u></b>	<b>V 13.11/12-1</b>
<b><u>Previous version:</u></b>	<b>V 12.10/01-1</b>
<b><u>Update in section:</u></b>	<b>General Update, 5, 7.2.1</b>

## **SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM**

### **CONTENTS**

- 1 INTENDED USE**
- 2 DIAGNOSTIC RELEVANCE**
- 3 TEST PRINCIPLE SERION ELISA *classic***
- 4 KIT COMPONENTS**
- 5 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**
- 6 STORAGE AND STABILITY**
- 7 TEST PROCEDURE SERION ELISA *classic***
  - 7.1 Evidence of Deterioration
  - 7.2 Sample Preparation and Storage
  - 7.3 Preparation of Kit Reagents
  - 7.4 Overview - Test Procedure
  - 7.5 Manual Test Procedure
  - 7.6 Automated Test Procedure
  - 7.7 Positive Control / Accuracy Control
- 8 TEST EVALUATION**
  - 8.1 Single-Point Quantification with the 4PL Method
  - 8.2 Criteria of Validity
  - 8.3 Calculation SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Limits of Quantification
  - 8.5 Borderline Ranges
  - 8.6 Interpretation of Results
  - 8.7 Reference Range of healthy Individuals
- 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS**
  - 9.1 Sensitivity and Specificity
  - 9.2 Reproducibility
- 10 SAFETY MEASURES**
  - 10.1 Statements of Warning
  - 10.2 Disposal
- 11 REFERENCES**



current version No.: V 13.11/12-1  
previous version: V 12.10/01-1

EN

ES

GR

PT

CZ

# SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

## Enzyme-immunoassay for determination of human antibodies for *in vitro* diagnostic use

SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgA	Order Nr.:	ESR118A
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgG	Order Nr.:	ESR118G
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgM	Order Nr.:	ESR118M

### 1 INTENDED USE

SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, IgG and IgM tests are quantitative and qualitative immunoassays for the detection of human antibodies in serum or plasma directed against *Helicobacter pylori*. The separate detection of individual immunoglobulin classes offers a confirmation of contact with the pathogen and the determination of the disease state.

### 2 DIAGNOSTIC RELEVANCE

*Helicobacter pylori* is a spirally formed gram negative bacterium which is highly motile due to it possessed up to seven flagellae. Microbiological identification is based on positive urea, catalase and oxidase tests as well as the absence of hippurate hydrolysis and nitrate reductase.

*Helicobacter pylori* is a very host specific organism. Other *Helicobacter* species are found in a variety of mammals such as cats, dogs, swine and mice.

Phenotypical differences between *H. pylori* isolates exclusively refer to expression/non-expression of vacuolating cytotoxin (VacA) and a second toxin which is encoded by cytotoxin-associated gene (CagA). Virulent (Type I) and non-virulent (Type II) *Helicobacter* strains can be distinguished on the basis of these phenotypical differences.

Patients with duodenal ulcers are more often infected by VacA and CagA expressing Type I *H. pylori* strains. There are, however, studies which consider that a causal relationship between *Helicobacter* infection and the associated disease syndrome of stomach cancer due to VacA and CagA producing *Helicobacter* strains is unlikely.

The person-to-person transmission mechanism for *H. pylori* is still not fully elucidated. The published literature considers the oral-oral and faecal-oral route to be likely. *H. pylori* infections are divided into two distinct groups of acute and chronic with 80 to 90 % of all gastritis cases being traceable to an *H. pylori* infection.

Diseases associated with *H. pylori* infections (ie those that can be traced back to a *H. pylori* induced gastritis) are ulcer duodeni (95 %), ulcer ventriculi (90 %) and the MALT (Mucosa Associated Lymphatic Tissue) lymphoma (60-70 %). Individuals suffering from chronic *Helicobacter pylori* infections have a six fold increased risk of developing MALT-lymphoma compared to healthy individuals.

A distinction between non-invasive and invasive methods is made in the diagnosis of *H. pylori* infections. Invasive procedures are those such as histology, urease rapid test (e.g. CLO test), microbiological techniques such as culture and molecular biologic tests (PCR). The C<sup>13</sup>-breath test and serological tests belong to the group of non-invasive methods.

European recommendations for the treatment of *Helicobacter pylori* infections were constituted by the European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG) in the “Maastricht-Consensus Conference” in 1997. An eradication therapy, the “triple therapy”, was recommended for all *H. pylori* positive patients with ulcers. Furthermore all dyspeptic patients younger than 45 and without distressing symptoms should be examined with non-invasive methods such as serology and, in the case of positive results, they should also be treated.

The detection of serum antibodies can be used for therapy control after eradication treatment. In this case a period of at least six months should lapse before initiating such antibody titer control measurements to ensure that significant titer changes can be detected. Particularly in the case of IgG, the possibility of persistence for months or years should be taken into account and this puts limitations on the information gleaned from purely serological control methods. The non-invasive C<sup>13</sup> breath-test is recommended for additional control.

*Helicobacter* associated infections have to be regarded in distinct relation to the age of the patients. The prevalence per life-decade increases at 10 % in the industrialized regions of North America and Central Europe. Total prevalence of the population in this area is 40 %.

### **3 TEST PRINCIPLE SERION ELISA *classic***

The ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) is an immunoassay, which is particularly suited to the determination of antibodies in the field of infectious serology. The reaction is based on the specific interaction of antibodies with their corresponding antigen. The test strips of the SERION ELISA *classic* microtiter plate are coated with specific antigens of the pathogen of interest. If antibodies in the patient's serum sample are present, they bind to the fixed antigen. A secondary antibody, which has been conjugated with the enzyme alkaline phosphatase, detects and binds to the immune complex. The colourless substrate p-nitrophenylphosphate is then converted into the coloured product p-nitrophenol. The signal intensity of this reaction product is proportional to the concentration of the analyte in the sample and is measured photometrically.

#### 4 KIT COMPONENTS

Test Components	Pieces / Volume
<p><b>Break apart microtiter test strips each with eight antigen coated single wells,</b> (altogether 96) <b>[MTP]</b>, 1 frame. The coating material is inactivated.</p>	12 pieces
<p><b>Standard serum (ready-to-use) [STD]</b>, Human serum in protein containing phosphate buffer; negative for anti-HIV Ab, HBs-Ag (Hepatitis B-Virus surface antigen) and anti-HCV Ab; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide; colouring: Amaranth O.</p>	2 x 2 ml
<p><b>Negative control serum (ready-to-use) [NEG]</b>, Human serum in protein containing phosphate buffer; negative for anti-HIV Ab, HBs-Ag (Hepatitis B-Virus surface antigen) and anti-HCV Ab; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide; colouring: Lissamin Green V.</p>	2 ml
<p><b>Anti-human IgA, IgG or IgM conjugate (ready-to-use) [APC]</b>, Anti-human IgA, IgG or IgM polyclonal antibody, conjugated to alkaline phosphatase, stabilised with protein stabilisation solution; preservative: 0.01 % methylisothiazolone, 0.01 % bromnitrodioxane.</p>	13 ml
<p><b>Washing solution concentrate (sufficient for 1000 ml) [WASH]</b>, Sodium chloride solution with Tween 20 and 30 mM Tris/HCl, pH 7,4; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide.</p>	33,3 ml
<p><b>Dilution buffer [DILB]</b>, Protein containing phosphate buffer with Tween 20; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide; colouring: 0.01 g/l Bromphenol blue.</p>	2 x 50 ml
<p><b>Stopping solution [STOP]</b>, 1.2 N sodium hydroxide.</p>	15 ml
<p><b>Substrate (ready-to-use) [pNPP]</b>, Para-nitrophenylphosphate in solvent free buffer; preservative: &lt; 0.1 % sodium azide (Substrate in unopened bottle may have a slightly yellow coloring, which does not reduce the quality of the product!)</p>	13 ml
<p><b>Quality control certificate with standard curve and evaluation table [INFO]</b>, (quantification of antibodies in IU/ml or U/ml).</p>	2 pages

## 5 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- common laboratory equipment
- for the IgM detection: SERION Rf-Absorbent, order no. Z200 (20 ml)
- photometer for microtitre plates with filter, wavelength 405 nm, recommended reference wavelength 620 nm - 690 nm (e.g. 650 nm)
- incubator 37 °C
- moist chamber
- distilled water
- Click-Clips (order no. VT120)

## 6 STORAGE AND STABILITY

Reagent	Storage	Stability
Microtiter strips (coated with antigen)	unopened  after opening at 2 – 8 °C in closed aluminum bag with desiccant  <i>Strips which are not used must be stored dry in the closed aluminum bag.</i>	see expiry date;  minimum shelf-life: four weeks;  shelf-life in case of proper use and storage until expiry date
Control sera / Standard sera	after opening at 2 – 8 °C	see expiry date; 24 months as of production
Conjugate	ready-to-use solution at 2 – 8 °C <i>Avoid contamination e.g. by using sterile tips.</i>	see expiry date; 28 months as of production
Dilution buffer	Unopened  after opening at 2 – 8 °C  <i>Discard cloudy solutions.</i>	see expiry date; 36 months as of production; 24 months
Washing solution	Concentrate after opening at 2 – 8 °C working dilution at 2 – 8 °C working dilution at room temperature <i>Bottles used for the working dilution should be cleaned regularly. Discard cloudy solutions.</i>	see expiry date; 2 weeks; 1 week
Substrate	ready-to-use solution at 2 – 8 °C, stored protected from light <i>Avoid contamination e.g. by using sterile tips.</i> <i>Discard if solution turns yellow (extinction against aqua dest. &gt; 0.25 OD).</i>	see expiry date; 36 months as of production
Stopping solution	After opening at room temperature	see expiry date

## 7 TEST PROCEDURE SERION ELISA *classic*

### 7.1 Evidence of Deterioration

Only use SERION ELISA *classic* reagents when using SERION ELISA *classic* immunoassays. The components must not be exchanged for reagents of other manufacturers. Standard and control sera of SERION ELISA *classic* immunoassays are defined exclusively for the test kit to be used and must not be used in other lots. Dilution buffer, washing solution, substrate and stop solution can be used for all SERION ELISA *classic* immunoassays irrespective of the lot and the test.

There are three different conjugate concentrations for each immunoglobulin class: LOW, MEDIUM, HIGH. The classification is written on each label as follows:

e.g. IgG +            low concentrated IgG conjugate  
      IgG ++        medium concentrated IgG conjugate  
      IgG +++       high concentrated IgG conjugate

In rare cases the use of special conjugate is necessary to guarantee consistent quality of our products. Special conjugates are produced in a separate lot and do not carry the “+” sign and are not exchangeable with other conjugates.

Please pay close attention to information on labels!

Unopened, all components of the SERION ELISA *classic* tests may, if stored accordingly, be used up to the expiry dates given on the labels. Reagents may not be used after date of expiry.

Dilution or alteration of the reagents may result in a loss of sensitivity.

Avoid exposure of reagents to strong light during storage and incubation. Reagents must be tightly closed after use to avoid evaporation and contamination.

To open the aluminum bag of the microtiter plate please cut off the top of the marked side only, in order to guarantee proper reclosing. Do not use the strips if the aluminum bag is damaged or if the bag with remaining strips and desiccant was not properly reclosed.

Use aseptic techniques when removing aliquots from the reagent tubes to avoid contamination. To avoid false positive results ensure not to contact or splash the top-walls of wells while pipetting conjugate. Take care not to mix the caps of the bottles and/or vials.

Reproducibility of test results is dependent on thorough mixing of the reagents. Agitate the flasks containing control sera before use and also all samples after dilution (e.g. by using a vortex mixer).

Be sure to pipette carefully and comply with the given incubation times and temperatures. Significant time differences between pipetting the first and last well of the microtiter plate



when dispensing samples and control sera, conjugate or substrate can result in different pre-incubation times, which may influence the precision and reproducibility of the results.

Optimum results can only be achieved if the instructions are strictly followed.

The SERION ELISA *classic* immunoassay is only valid if the lot-specific validation criteria on the quality control certificate are fulfilled.

Adequate washing avoids test unspecificities. Therefore, the washing procedure should be carried out carefully. All of the flat bottom wells should be filled with equal volumes of washing buffer. At the end of the procedure ensure that the wells are free of all washing buffer in order to avoid uncontrolled dilution effects. Avoid foaming!

Take care not to damage the inscription (pathogen / antibody class) on the microtiter test strips during washing and aspiration to avoid confusion.

## 7.2 Sample Preparation and Storage

Lipaemic, hemolytic or icteric samples (serum or plasma) should only be tested with caution. Obviously contaminated samples should not be tested. Serum or plasma (EDTA, citrate, heparin) collected according to standard laboratory methods are suitable samples. Samples must not be thermally inactivated.

### 7.2.1 Dilution of Samples

Before running the test, patient samples ( $V_1$ ) must be diluted in dilution buffer ( $V_2$ ) as follows:

#### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	add	10 $\mu$ l	patient's sample
	each to	1000 $\mu$ l	dilution buffer

After dilution and before pipetting into the microtiter plate the samples must be mixed thoroughly to prepare a homogenous solution.

## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM

### Interference with rheumatoid factors

Rheumatoid factors are autoantibodies mainly of the IgM class, which preferably bind to IgG immune complexes. The presence of non-specific IgM antibodies (rheumatoid factors) can lead to false-positive results in the IgM assay. Furthermore, the possibility exists, that weak-binding pathogen-specific IgM antibodies may be displaced by stronger-binding IgG antibodies leading to a false negative IgM result. Therefore it is necessary to pretreat samples with rheumatoid factor-absorbents prior to IgM detection (SERION RF-Absorbent, Order Nr.: Z200 (20 ml/100 tests)). Rf-absorption is performed by incubation of the patient's sample in Rf-dilution buffer for 15 minutes at room temperature or over night at 4 °C. The test procedure is described in a separate instruction manual.

Before running the test, rheumatoid factor-absorbent ( $V_1$ ) must be diluted 1+4 in dilution buffer ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	add	200 $\mu$ l	Rf-absorbent
		each to 800 $\mu$ l	dilution buffer

Patient's samples ( $V_4$ ) must be diluted in this Rf-dilution buffer ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	add	10 $\mu$ l	patient's sample
		each to 1000 $\mu$ l	Rf-dilution buffer

After dilution and before pipetting into the microtiter plate the samples must be mixed thoroughly to prepare a homogenous solution.

### 7.2.2 Sample Storage

The patient's samples should not be stored for more than 7 days at 2 – 8 °C. Extended storage is possible at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freezing and thawing of samples. Diluted samples can be stored at 2 – 8 °C for one week.

### 7.3 Preparation of Kit Reagents

Bring all reagents to room temperature before testing.

#### 7.3.1 Microtiter Test Strips

The microtiter test strips in frames are packed with a desiccant in an aluminum bag. Take unrequired cavities out of the frame and put them back into the aluminum bag. Close bag carefully to ensure airtight conditions.

#### 7.3.2 Control Sera / Standard Sera

Control and standard sera are ready-to-use and must not be diluted any further. For each test run - independent of the number of microtiter test strips to be used - control and standard sera must be included. The standard sera should be set up in duplicate.

Do not treat control sera with Rf-absorbent.

#### 7.3.3 Anti-human IgA, IgG or IgM AP-Conjugate (ready-to-use)

Conjugates with the same concentration and of the same immunoglobulin class are interchangeable. Avoid contamination of ready-to-use conjugates e. g. by using sterile tips.

#### 7.3.4 Washing Solution

Dilute washing buffer concentrate ( $V_1$ ) 1:30 with aqua dest. to a final volume of  $V_2$ .

Example:

Buffer concentrate ( $V_1$ )	Final volume ( $V_2$ )
33.3 ml	1000 ml
1.0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Dilution Buffer for Samples (ready-to-use)

#### 7.3.6 Substrate (ready-to-use)

Avoid contamination of the ready-to-use substrate solution e. g. by using sterile tips.

#### 7.3.7 Stopping Solution (ready-to-use)

## 7.4 Overview - Test Procedure

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM quantitative

In case of IgM detection absorption of rheumatoid factor, see No. 7.2.1;  
Incubation 15 minutes at room temperature or over night at 4 °C

sample dilution<sup>1</sup>  
(patient's samples)  
1+100

Pipette diluted samples and ready-to-use control /  
standard sera into the microtest wells (100 µl)



INCUBATION 60 Min./ 37 °C  
moist chamber



WASH (4 x 300 µl [DIL] [WASH] )<sup>2</sup>



Pipette conjugate solution [APC] (100 µl)



INCUBATION 30 Min./ 37 °C  
moist chamber



WASH (4 x 300 µl [DIL] [WASH] )<sup>2</sup>



Pipette substrate solution [pNPP] (100 µl)



INCUBATION 30 Min./ 37 °C  
moist chamber



Pipette stopping solution [STOP] (100 µl)



READ EXTINCTION at 405 nm

<sup>1</sup>Special dilution buffers for the following SERION ELISA *classic* tests:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Parvovirus B19 IgM and Hantavirus Puumala IgG, IgM

<sup>2</sup>For manual use:  
tap plate at the end of the wash procedure on paper towel.

## 7.5 Manual Test Procedure

1. Place the required number of **cavities in the frame** and prepare a protocol sheet.
2. Add each **100 µl of diluted sample or ready-to-use controls** into the appropriate wells of microtiter test strips. Spare one well for substrate blank, e.g.:

IgA/IgG/IgM quantitative	
well no.	
well A1	Substrate blank
well B1	Negative Control
well C1	Standard serum
well D1	Standard serum
well E1	Patient 1....

3. **Sample incubation** for 60 minutes (+/- 5 min) at 37 °C (+/- 1 °C) in moist chamber
4. After incubation **wash** all wells with washing solution (by automated washer or manually):
  - aspirate or shake out the incubation solution
  - fill each well with 300 µl washing solution
  - aspirate or shake out the washing buffer
  - repeat the washing procedure 3 times (altogether 4 times!)
  - dry by tapping the microtiter plate on a paper towel
5. **Addition of conjugate**  
Add 100 µl of the ready-to-use IgA/IgG/IgM conjugate to the appropriate wells (except substrate blank)
6. **Conjugate incubation** for 30 minutes (+/- 1 min)\* at 37 °C (+/- 1 °C) in moist chamber.
7. After incubation **wash** all wells with washing solution (see above)
8. **Addition of substrate**  
Add 100 µl of ready-to-use substrate solution to each well (including well for substrate blank!)
9. **Substrate incubation** for 30 minutes (+/- 1 min)\* at 37 °C (+/- 1 °C) in moist chamber.
10. **Stopping of the reaction**  
Add 100 µl stopping solution to each well, shake microtiter plate gently to mix.
11. **Read extinction**  
Read optical density (OD) within 60 minutes at 405 nm against substrate blank, reference wave length between 620 nm and 690 nm (e.g. 650 nm).

\* Please note, that under special working-conditions internal laboratory adaptations of the incubation times may be necessary.

## 7.6 Automated Test Procedure

SERION ELISA are suited for processing on automats and evaluated for use with Immunomat™ as well as with DYNEX DSX® and DS2®. The automated processing is performed analogous to manual use. Please note, that under special working-conditions internal laboratory adaptations of the incubation times may be necessary.

## 7.7 Positive Control / Accuracy Control

For the periodic verification of the test method, in order to fulfil the requirements of laboratory internal quality management systems, we recommend using SERION ELISA *controls* to determine precision and accuracy of SERION ELISA *classic* test runs. The use of SERION ELISA *controls* is described in specific instruction manuals.

## 8 TEST EVALUATION

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Single-Point Quantification with the 4PL Method

Optimised assignment of extinction signals to quantitative values is guaranteed by using non-linear functions, which adjust a sigmoide curve without any further transformation to OD-values. Determination of antibody concentrations with the SERION ELISA *classic* is carried out by the 4 parameter logistic-log-model (4 PL) which is ideal for exact curve-fitting. It is based on the formula:

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{Conc.})}}$$

The parameters A, B, C, and D are representative for the exact shape of the curve:

- |                       |               |
|-----------------------|---------------|
| 1. lower asymptote    | ⇒ parameter A |
| 2. slope of the curve | ⇒ parameter B |
| 3. turning point      | ⇒ parameter C |
| 4. upper asymptote    | ⇒ parameter D |

For each lot the standard curve is evaluated by Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg, Germany) in repeated test runs under optimal conditions. Time consuming and cost intensive construction of the standard curve by the user is not necessary.

For evaluation of antibody concentrations a lot specific standard curve as well as a lot specific evaluation table is included with each SERION ELISA *classic* test kit. The evaluation software SERION *evaluate* as well as the Microsoft® Excel-based software tool SERION *activity* are available on request.

To compensate for normal test variations and also for test run control a standard serum is used in each individual test run. For this control serum a reference value with a validity range is determined by the quality control of the producer. Within this range a correct quantification of antibody concentration is ensured.

## 8.2 Criteria of Validity

- The substrate blank must be < 0.25 OD.
- The negative control must produce a negative test result.
- By use of quantitative SERION ELISA *classic* tests the mean OD-value (after subtraction of the substrate blank!) of the standard serum must be within the validity range, which is given on the lot specific quality control certificate.
- The variation of OD-values of the standard serum may not be higher than 20 %.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

## 8.3 Calculation SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Non-automated Evaluation

For the SERION ELISA *classic* test evaluation a lot-specific quality control certificate with standard curve and an evaluation table is included in the test kit so that the obtained OD values may be assigned to the corresponding antibody activities. The substrate blank must be subtracted from all OD values prior to evaluation.

#### Method 1: Qualitative Evaluation

To fix the cut-off ranges multiply the mean value of the measured standard OD with the numerical data of the quality control certificate (see special case formulas), e.g.:

OD = 0.502 x MW(STD) with upper cut-off

OD = 0.352 x MW(STD) with lower cut-off

If the measured mean absorbance value of the standard serum is 0.64 OD, the range of the cut-off is in between 0.225-0.321 OD.



## Method 2:

### Continuous Determination of Antibody Activities using the Standard Curve

So called interassay variations (day to day deviations and laboratory to laboratory deviations) are compensated by multiplication of the current measured value obtained with a patient's sample with the correction factor F. This factor is calculated as follows:

$$F = \frac{\text{OD-reference value (of standard serum)}}{\text{OD-current value (of standard serum)}}$$

The procedure is necessary to adjust the current test level of the user with the lot-specific standard curve. First, daily deviations have to be corrected by calculating the correction factor F.

1. The mean of the two OD-values of the standard serum has to be calculated and checked that it is within the given validity range.
2. Calculation of the factor F: the given reference value is divided by the mean of the extinction of the standard serum:  
 $F = \text{reference value extinction STD serum} / \text{mean value extinction STD serum}.$
3. All measured values of patient's samples are multiplied by F.
4. Antibody activities in IU/ml or U/ml can be determined from the standard curve with the corrected values.

### 8.3.2 Automatic Test Evaluation with Software SERION *evaluate*

After input of the four parameters and the reference value of the standard serum, antibody activities are calculated online from processed and measured SERION ELISA *classic* test runs by the evaluation software SERION *evaluate*.

If the optical density of the standard is out of the validity range, the following message will appear.

„Standard values out of ranges in following groups: Group 1-24.” or

„Standard values differ more than 20 % in following groups: Group 1-24.”

In these cases the test run is invalid and should be repeated.

Parameters and reference value need to be changed only if there is a change of lot (evaluation table shows parameters and reference values). Correct input of the lot specific data can be checked on the basis of the standard serum activity (in IU/ml or U/ml) assigned to the standard serum. The calculated mean value of the units has to correspond to the unit value indicated on the lot specific certificate. There is an automatic correction of the measured values. In the standard version the printout displays the following:

Sample code OD-value IU/ml or U/ml Evaluation
--

## 8.4 Limits of Quantification

The limits of quantification are specified on the quality control certificate of the SERION ELISA *classic* test. The linearity of dilution within this range has been demonstrated in comprehensive evaluation studies. In case a patient sample shows a test result above the upper limit of quantification, the sample may be tested at a higher dilution. The thereby determined antibody activity must be multiplied by the additional dilution factor.

## 8.5 Borderline Ranges

The borderline ranges of the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM tests are specified on the quality control certificates and indicate the range for borderline test results. Values obtained, when testing a patient's sample, which fall below this range indicate a negative test result; values above the borderline range are interpreted positive. In cases where the results are within the borderline range a definitive interpretation of the result is not possible. In such cases, the test should be repeated in parallel with a follow-up sample taken one to two weeks later (serum pair).

## 8.6 Interpretation of Results

Positive results in the SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG, IgA and IgM tests indicate the presence of specific antibodies directed against *Helicobacter pylori*. A positive serological result should always be interpreted with consideration of the patient's history and clinical picture, as a positive result does not definitely distinguish between a current disease state and antibodies due to seroprevalence rates in the general population. A negative result however indicates a seronegative status in the patient. In a case of clinical suspicion of an infection such negative results do not however rule out the possibility of infection, as the sample may have been taken too early to for antibodies to be detectable. In such cases a further sample should be taken approximately two weeks later.

*Helicobacter* serology should not be performed by focusing only on detection of IgG antibodies since the antibody constellation IgG negative/IgA positive may be found in 2 to 7 % of patients with acute *Helicobacter pylori* infections. On the other hand 15 to 35 % of patients with acute *Helicobacter pylori* infections do not produce pathogen specific IgA, making diagnosis only possible by the detection of alternative immunoglobulin classes. Therefore, both, *Helicobacter* IgG and IgA serology should be performed simultaneously. The following antibody constellations can be interpreted as follows:

**Table 1: Interpretation of various antibody constellations in *Helicobacter* serology**

IgM	IgA	IgG	interpretation
-	-	-	seronegative status, in case of clinical symptoms, control sera should be taken about 2 weeks later
+/-	-	+	seropositive status after antigen contact or active infection with lacking IgG response, seroprevalence depending on the age of patient („contagion“)
-	-	+	
+/-	+	+	suspected active infection with <i>H. pylori</i> ; typical reaction pattern in patients with (active) gastritis
+/-	+	-	suspected active infection with <i>H.pylori</i> , lacking IgG-response (2-7% of cases)

## 8.7 Reference Range of healthy Individuals

Testing of random blood donor sera, collected in the region of southern Germany, with the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, IgG and IgM tests resulted in the following distribution. From 47 sera tested with the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA test, 39 (83.0 %) were negative, five sera (10.6 %) reacted positive and three sera (6.4 %) were considered borderline. Of 47 sera, 41 (87.2 %) were negative when tested with the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG test, four (8.5 %) sera yielded a positive result and two (4.3 %) were evaluated as borderline. In addition, results from testing 47 sera in the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM test were as follows; 35 sera (74.5 %) tested negative, six (12.8 %) positive and six (12.8 %) sera were borderline.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Sensitivity and Specificity

#### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG:

In order to establish the performance characteristics for the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG a total of 88 sera were examined. Of these 41 were random blood donors and 47 sera from patients with suspected *Helicobacter* infection supported by previous test results. The sera were tested in the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG and in additional two commercially available ELISAs to provide the following performance data.

SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgG	Sensitivity	Specificity
Performance data versus ELISA 1	96.6 %	94.3 %
Performance data versus ELISA 2	91.1 %	> 99 %

In addition, an external study was carried out by AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) in France. This consisted of the examination of a total of 92 sera. 44 of 45 samples from patients with proven Helicobacter infection were correctly identified by the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori test while one serum was identified as borderline. 42 of 47 serum samples from proven non-infected individuals were recorded as negative, 2 as borderline and three sera were false positive. These results support the results of the internal study. Detailed results of this external study are available at <http://www.afssaps.fr>

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA:

To evaluate the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA a total of 146 serum samples were tested. Serum group 1 consisted of 54 random blood donor sera while serum group 2 contained 87 sera from gastroscopy patients whose biopsy material tested urease positive (CLO test) and were characterised as *H. pylori* positive on the basis of histological tests. In addition 5 sera from patients with antibodies against *Campylobacter jejuni* were examined for cross-reactions.

The samples were tested in the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA in comparison to four additional commercially available ELISA tests (tests A to D). Discrepant results (i.e. any sera that did not produce the same result in at least 4 of the 5 ELISA tests) were evaluated using a commercial immunoblot test.

#### Results: Serum group 1:

Test	Correlation	Prevalence	Sensitivity	Specificity
SERION ELISA <i>classic</i>	96.0 %	20.0 %	80.0 %	100 %
ELISA A	93.0 %	16.3 %	100 %	91.7 %
ELISA B	93.9 %	20.4 %	80.0 %	97.4 %
ELISA C	84.3 %	19.6 %	20.0 %	100 %
ELISA D	95.7 %	19.1 %	88.9 %	97.4 %

A total of ten sera were determined to be positive. Eight sera were positive in the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori test and ELISAs B and D. ELISA A was the most sensitive test, however three sera were in the borderline region and not used in the statistical calculation. There were no significant differences in the calculations of prevalence.

#### Results: Serum group 2:

Test	Korrelation	Prevalence	Sensitivity	Specificity
SERION ELISA <i>classic</i>	91.3 %	59.4 %	85.4 %	100 %
ELISA A	82.2 %	67.1 %	100 %	45.8 %
ELISA B	88.9 %	61.1 %	81.8 %	100 %
ELISA C	86.3 %	65.0 %	78.8 %	100 %
ELISA D	89.5 %	63.2 %	83.3 %	100 %

In the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA and ELISAs B-D, 28 sera from 87 sequentially collected sera were evaluated as definitely negative. In ELISA A 13 of these sera produced positive results. The prevalence indicates the proportion of positive results

within the serum groups. The calculated sensitivity is lower when compared to the IgG ELISA. This is partly due to the IgA immune response being primarily directed against the CagA and urease B proteins from *H.pylori* while the IgG response is directed against the complete protein complement of the organism.

The observed differences in the IgG and IgA antibody responses in addition to the fact that the urease B protein is mainly responsible for non-specific antibody binding is a probable reason for the lower correlation of the IgA determinations and, in particular, that the comparison of ELISA and immunoblot is only partly possible. This study does emphasise the importance of IgA antibody detection in the diagnosis of *H. pylori* infections and demonstrates a 2 to 5 fold higher prevalence of IgA antibodies in patients with confirmed infection (serum group 2) when compared to the normal population (serum group 1). Cross-reactions were not seen in the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA to *Campylobacter jejuni* (five sera tested). This was also the case in ELISAs B to D whereas in ELISA A one serum was recorded as positive.

When all 146 sera are included the calculated performance characteristics for the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA are sensitivity 84.3 % and specificity 100 % with the best correlation result of 93.5 %. Only ELISA A had a sensitivity of 100 % and this was at the cost of a low specificity of 73.8 %. ELISAs B and D are comparable to the SERION ELISA *classic* test with sensitivities of 81.5 % and 84.2 % and specificities of 98.6 % and 100 %. ELISA C had the worst sensitivity with 69.4 % (100 % specificity)

### **SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM**

To evaluate the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM a total of 186 serum samples from adults were tested. Serum group 1 consisted of 45 random blood donor sera while serum group 2 contained 119 sera with demonstrated infection. A third serum panel, serum group 3, consisted of six sera from patients with antibodies against *Campylobacter jejuni*, seven *Chlamydia spec* seropositive, three with antibodies to *Borrelia burgdorferi*, three with *Legionella pneumophila* antibodies, one with *Brucella spec.* antibodies and ten sera with elevated rheumatoid factor activity.

The samples were tested in the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM in comparison to two additional commercially available ELISA tests. While only two comparable ELISA tests of adequate quality and no immunoblot test were available, positive results were additionally tested in IgG and IgA ELISA tests. To determine the sensitivity and specificity, a direct comparison with the commercial test and SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM was made.

3.2 % of the serum samples (6/186) reacted positive in at least the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM and one other ELISA test, likewise six of the sera tested were in at least one additional ELISA borderline. The international published literature indicates an IgM positive rate in the general population of 1 % to 11 %, which is supported by the results obtained in this study. In total 98 (140) sera were evaluated as negative in all ELISAs (at least in two ELISAs). This equates to 52.7 % (75.3 %). No sample reacted positive in all three ELISA tests although seven reacted borderline in at least two ELISAs (3.8 %). In total, at least 59 sera (31.7 %) reacted borderline in at least one test. Taking all 186 sera into account the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM in comparison to

two other ELISAs delivered a sensitivity of 100 % and compared to ELISA A a specificity of 80.1 % (correlation 80.3 %) and to ELISA B a specificity of 75.5 % (correlation 76 %). The reduced sensitivities result from the fact that neither of the comparison tests recognised any sera positive, so rendering a comparison of sensitivities between these two tests impossible. If only the 45 blood donor sera are included in the calculations then the sensitivities and the correlation lies some 10 % higher. It is to note that the 45 blood donor sera were previously evaluated and designated as positive in earlier studies. In 17 of 119 patients, independent positive test results were recorded. ELISA A recorded along with the SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM a total of one positive serum and ELISA B five. IgM antibodies are frequently accompanied by IgG antibodies.

## 9.2 Reproducibility

Intraassay reproducibility was determined by testing sera of different reactivities 20 times in one test run. Interassay reproducibility was determined by testing sera of different reactivities 10 times in 10 independent assays performed on 5 different days.

$$\text{Coefficient of Variation (CV \%)} = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean value}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgA:

Sample	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
negative	0.499	3.4	0.467	9.9
borderline	0.627	4.6	0.580	10.0
strong positive	1.263	3.6	1.286	7.7

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgG:

Sample	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
borderline	0.442	4.5	0.423	13.8
strong positive	1.513	2.4	1.514	11.0
strong positive	1.615	3.1	1.599	9.8

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgM:

Sample	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
borderline	0.342	5.8	0.346	13.0
borderline	0.371	4.7	0.385	9.9
positive	0.658	5.5	0.661	9.2




## 10 SAFETY MEASURES

### 10.1 Statements of Warning

The SERION ELISA *classic* is designed for use by qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

All kit reagents and human specimens should be handled carefully, using established good laboratory practice.

- This kit contains human blood components. Although all control- and cut-off sera have been tested and found negative for anti-HIV-ab, HBs-Ag (*Hepatitis B-Virus-surface Antigen*) and anti-HCV-ab, they should be considered potentially infectious.
- Do not pipette by mouth.
- Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable gloves, laboratory coat and safety glasses while handling kit reagents or specimens. Wash hands thoroughly afterwards.
- Patient's material and other potentially infectious material should be decontaminated after the test run.
- Reagents should be stored safely and be unaccessible to unauthorized access e.g. children.
- Stopping solution:  corrosive (C); causes acid burn (R34)  
Use safety glasses, gloves and laboratory coat while handling!

### 10.2 Disposal

Please observe the relevant statutory requirements!

## 11 REFERENCES

- [1] Blaser, M. J. (1998) *Helicobacter pylori* and associated diseases. *BMJ* 316, 1507-10.
- [2] Heilmann, K. L., Borchard, F. (1991) Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrastructural findings. *GUT* 32, 137-40.
- [3] Kosunen, T. U. *et al.* (1992) Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339, 893-95.
- [4] Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori – Von der Grundlage zur Therapie* Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage, 11-23.
- [5] Malfertheiner, P. *et al.* (1997) Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Eur. J. Gastroent. Hep.* 9, 1-2.
- [6] Malfertheiner, P. *et al.* (1998) *Helicobacter pylori* Infektionen und Ulkuserkrankungen. *Chirurg* 69, 239-48.
- [7] Malfertheiner, P. (2004) *Helicobacter pylori* Infection – ein Update 2004. *Deutsch-Medizinische Wochenschrift* 129, 1821-6.
- [8] The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG, 1997): Current European concepts in the Management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut* 41, 8-13.
- [9] Warren, J. R., Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-5.
- [10] Xiang, Z., *et al.* (1995) Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63, 94.
- [11] Yamaoka, Y. *et al.* (1999) Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* 52, 215-8.



# Actualizaciones

**Preste atención a las diferencias en comparación con la versión anterior.**

**Nº de la versión actual: V 13.11/12-1**

**Versión anterior: V 12.10/01-1**

**Actualización en la sección: Actualización general, 5, 7.2.1**

## **SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM**

### **CONTENIDO**

- 1 USO PREVISTO**
- 2 PERTINENCIA DIAGNÓSTICA**
- 3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic***
- 4 COMPONENTES DEL KIT**
- 5 MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO**
- 6 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**
- 7 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic***
  - 7.1 Evidencia de deterioro
  - 7.2 Preparación y conservación de la muestra
  - 7.3 Preparación de reactivos del kit
  - 7.4 Visión general - procedimiento de la prueba
  - 7.5 Procedimiento manual
  - 7.6 Procedimiento automatizado
  - 7.7 Control positivo / control de exactitud
- 8 EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS**
  - 8.1 Cuantificación de punto simple con el método 4PL
  - 8.2 Criterios de validez
  - 8.3 Cálculos del SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Límites de cuantificación
  - 8.5 Intervalos dudosos
  - 8.6 Interpretación de resultados
  - 8.7 Intervalos de referencia de individuos sanos
- 9 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO**
  - 9.1 Sensibilidad y especificidad
  - 9.2 Reproducibilidad
- 10 MEDIDAS DE SEGURIDAD**
  - 10.1 Declaraciones de advertencia
  - 10.2 Eliminación
- 11 BIBLIOGRAFÍA**



# SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

## Enzimoimmunoensayo para la determinación de anticuerpos humanos Para uso diagnóstico *in vitro*

SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgA	Nº de pedido:	ESR118A
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgG	Nº de pedido:	ESR118G
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgM	Nº de pedido:	ESR118M

### 1 USO PREVISTO

Las pruebas de SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, IgG e IgM son inmunoensayos cuantitativos y cualitativos para la detección de anticuerpos humanos en suero o plasma dirigidos frente a *Helicobacter pylori*. La detección por separado de clases de inmunoglobulinas individuales ofrece una confirmación del contacto con el patógeno y la determinación del estado de la enfermedad.

### 2 PERTINENCIA DIAGNÓSTICA

*Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa con forma en espiral de gran motilidad debido a que posee hasta siete flagelos. La identificación microbiológica se basa en resultados positivos en pruebas de urea, catalasa y oxidasa así como en la ausencia de hidrólisis de hipurato y de nitrato reductasa.

*Helicobacter pylori* es un organismo muy específico del hospedador. Otras especies de *Helicobacter* pueden encontrarse en una amplia variedad de mamíferos como los gatos, perros, cerdos y ratones.

Las diferencias fenotípicas entre aislados de *H. pylori* se refieren exclusivamente a la expresión/no expresión de citotoxina vacuolar (VacA) y una segunda toxina que está codificada por un gen asociado a la citotoxina (CagA). Se pueden distinguir cepas virulentas (Tipo I) y no virulentas (Tipo II) de *Helicobacter* basándose en estas diferencias fenotípicas.

Los pacientes con úlceras duodenales son infectados con mayor frecuencia por cepas de *H. pylori* del Tipo I que expresan VacA y CagA. Existen, sin embargo, estudios que consideran que es improbable una relación causal entre la infección por *Helicobacter* y el síndrome asociado de cáncer de estómago debido a cepas de *Helicobacter* productoras VacA y CagA.

El mecanismo de transmisión de *H. pylori* de una persona a otra aún no ha sido explicado por completo. La literatura publicada considera probables la vía oral-oral y fecal-oral. Las infecciones por *H. pylori* se divide en dos grupos distintos de agudas y crónicas, pudiéndose atribuir del 80 al 90% de los casos de gastritis a una infección por *H. pylori*.

Las enfermedades asociadas con las infecciones por *H. pylori* (es decir aquellas que pueden ser atribuidas a una gastritis inducida por *H. pylori*) son la úlcera duodenal (95 %), úlcera ventricular (90 %) y el linfoma TLAM (tejido linfático asociado a mucosas) (60-

70 %). Los individuos que padecen infecciones crónicas de *Helicobacter pylori* tienen un riesgo seis veces mayor de desarrollar linfoma TLAM en comparación a los individuos sanos.

Se puede distinguir entre los métodos no invasivos y los invasivos en el diagnóstico de las infecciones por *H. pylori*. Procedimientos invasivos son la histología, la prueba rápida de ureasa (p.ej. la prueba CLO), técnicas microbiológicas como el cultivo y los análisis biológicos moleculares (PCR). La prueba del aliento con urea C<sup>13</sup> y las pruebas serológicas pertenecen al grupo de métodos no invasivos.

Las recomendaciones europeas para tratamiento de las infecciones por *Helicobacter pylori* fueron constituidas por el grupo de estudios europeo sobre *Helicobacter pylori* (European *Helicobacter pylori* Study Group, EHPSG) en la “Conferencia de consenso de Maastricht” en 1997. Se recomendó una terapia de erradicación, la “triple terapia”, para todos los pacientes con úlcera positivos para *H. pylori*. Además todos los pacientes dispépticos menores de 45 años y sin síntomas de distrés deben ser examinados con métodos no invasivos tales como la serología y, en caso de resultados positivos, también deben recibir tratamiento.

La detección de anticuerpos séricos se puede utilizar para el control terapéutico después del tratamiento de erradicación. En este caso debe haber un período de por lo menos seis meses antes del inicio de dichas medidas de control del título de anticuerpos para garantizar que se puedan detectar cambios significativos en los títulos. Particularmente en el caso de la IgG, se debe tener en cuenta la posibilidad de persistencia durante meses o años y esto pone limitaciones a la información obtenida a partir de métodos de control puramente serológicos. Se recomienda la prueba no invasiva de urea C<sup>13</sup> en el aliento para un control adicional.

Las infecciones asociadas a *Helicobacter* deben contemplarse en clara relación a la edad de los pacientes. La prevalencia por década de vida aumenta al 10 % en las regiones industrializadas de Norteamérica y Europa central. La prevalencia total de la población en esa zona es del 40 %.

### **3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic***

La prueba ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas) es un inmunoensayo, que es particularmente apropiado para la determinación de anticuerpos en el campo de la serología infecciosa. La reacción se basa en la interacción específica de anticuerpos con su antígeno correspondiente. Las tiras reactivas de la placa de microtitulación de SERION ELISA *classic* se recubren con antígenos específicos del agente patógeno de interés. Si los anticuerpos en la muestra de suero del paciente están presentes, se unen al antígeno fijado. Un anticuerpo secundario, que se ha conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, detecta y se une al complejo inmune. El sustrato incoloro p-nitrofenolfosfato se convierte entonces en el producto coloreado p-nitrofenol. La intensidad de la señal de este producto de reacción es proporcional a la concentración del analito en la muestra y se mide fotométricamente.

#### 4 COMPONENTES DEL KIT

Componentes de la prueba	partes / Volumen
<p><b>Pocillos de microtitulación en tiras separables, cada una de ellas con ocho pocillos individuales recubiertos de antígeno</b>            (En total son 96) <b>MTP</b>,            1 bastidor.            El material de recubrimiento está inactivado.</p>	12 partes
<p><b>Suero patrón (listo para usar) <b>STD</b></b>,            Suero humano en tampón fosfato que contiene proteína;            negativo para Ac anti-VIH, Acs HB (HBs-Ag, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y Ac anti-VHC;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %;            colorante: Amaranto O.</p>	2 x 2 ml
<p><b>Suero control negativo (listo para usar) <b>NEG</b></b>,            Suero humano en tampón fosfato que contiene proteína;            negativo para Ac anti-VIH, Acs HB (HBs-Ag, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y Ac anti-VHC;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %;            colorante: Verde Lissamin Green V.</p>	2 ml
<p><b>Conjugado FA de IgA, IgG o IgM anti-humana (listo para usar) <b>APC</b></b>,            Anticuerpo policlonal IgA, IgG o IgM anti-humano,            conjugado con fosfatasa alcalina, estabilizado con solución que contiene proteínas;            conservante: metilisotiazolona al 0,01 %, bromonitrodioxano al 0,01 %.</p>	13 ml
<p><b>Concentrado de dilución de lavado (suficiente para 1000 ml) <b>WASH</b></b>,            Solución de cloruro de sodio con Tween 20 y 30 mM Tris/HCl, pH 7,4;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %.</p>	33,3 ml
<p><b>Solución amortiguadora de dilución <b>DILB</b></b>            Tampón fosfato con Tween 20 que contiene proteína;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %;            colorante: 0,01 g/l de azul de bromofenol.</p>	2 x 50 ml
<p><b>Solución de parada <b>STOP</b></b>,            hidróxido de sodio 1,2 N.</p>	15 ml
<p><b>Sustrato (listo para usar) <b>pNPP</b></b>,            Para-nitrofenilfosfato en solución amortiguadora sin disolvente;            conservante: azida sódica &lt; 0,1 %            (¡El sustrato en un frasco sin abrir puede tener una coloración ligeramente amarilla, lo que no reduce la calidad del producto!)</p>	13 ml
<p><b>Certificado de control de calidad con curva patrón y tabla de evaluación <b>INFO</b></b>,            (cuantificación de anticuerpos en UI/ml o U/ml).</p>	2 páginas

## 5 MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- equipo habitual de laboratorio
- Para la detección de IgM: Absorbente Rf SERION, nº de pedido Z200 (20 ml)
- fotómetro para placas de microtitulación con filtro, longitud de onda 405 nm, longitud de onda de referencia recomendada 620 nm - 690 nm (p.ej., 650 nm)
- incubador a 37 °C
- cámara de humectación
- agua destilada
- Clips de cierre por presión (Click-Clips, nº de pedido VT120)



## 6 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Reactivo	Conservación	Estabilidad
Tiras de microtitulación (recubiertas con antígeno)	<p>sin abrir</p> <p>tras la apertura entre 2 – 8 °C en una bolsa de aluminio cerrada con desecante</p> <p><i>Las tiras que no se utilizan se deben conservar secas en la bolsa de aluminio cerrada.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>período de conservación mínimo: cuatro semanas;</p> <p>período de conservación en caso de utilización y conservación adecuadas hasta la fecha de caducidad</p>
Sueros control / Sueros patrón	tras la apertura entre 2 – 8 °C	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>24 meses desde su producción</p>
Conjugado	<p>solución lista para usar entre 2 – 8 °C</p> <p><i>Evite la contaminación p.ej., utilizando puntas estériles.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>28 meses desde su producción</p>
Solución amortiguadora de dilución	<p>Sin abrir</p> <p>tras la apertura entre 2 – 8 °C</p> <p><i>Deseche las soluciones turbias.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>36 meses desde su producción;</p> <p>24 meses</p>
Solución de lavado	<p>Concentrado tras la apertura entre 2 – 8 °C</p> <p>dilución de trabajo entre 2 – 8 °C</p> <p>dilución de trabajo a temperatura ambiente</p> <p><i>Los frascos utilizados para la dilución de trabajo se deben limpiar regularmente. Deseche las soluciones turbias.</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>2 semanas;</p> <p>1 semana</p>
Sustrato	<p>solución lista para usar entre 2 – 8 °C, conservar protegida de la luz</p> <p><i>Evite la contaminación p.ej., utilizando puntas estériles.</i></p> <p><i>Desechar si la solución se vuelve amarilla (extinción frente al agua destilada &gt; 0,25 DO).</i></p>	<p>ver fecha de caducidad;</p> <p>36 meses desde su producción</p>
Solución de parada	Tras la apertura a temperatura ambiente	ver fecha de caducidad

## 7 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA SERION ELISA *classic*

### 7.1 Evidencia de deterioro

Utilice únicamente reactivos SERION ELISA *classic* al utilizar inmunoensayos SERION ELISA *classic*. Los componentes no deben intercambiarse con reactivos de otros fabricantes. Los sueros patrón y control de los inmunoensayos SERION ELISA *classic* immunoassays están definidos exclusivamente para el kit de pruebas que se va a utilizar y no deben utilizarse en otros lotes. La solución amortiguadora de dilución, la solución de lavado, el sustrato y la solución de parada se pueden utilizar para todos los inmunoensayos SERION ELISA *classic* Independientemente del lote y de la prueba.

Existen tres concentraciones de conjugado diferentes para cada clase de inmunoglobulina: BAJO, MEDIO, ALTO. La clasificación aparece escrita en cada etiqueta como sigue:

p.ej.	IgG +	Conjugado de IgG de baja concentración
	IgG ++	Conjugado de IgG de media concentración
	IgG +++	Conjugado de IgG de alta concentración

En raros casos es necesaria la utilización de un conjugado especial para garantizar una calidad constante de nuestros productos. Los conjugados especiales se producen en un lote por separado y no llevan el signo “+” y no son intercambiables con otros conjugados.

¡Preste mucha atención a la información de las etiquetas!

Si no han sido abiertos, todos los componentes de las pruebas SERION ELISA *classic* pueden, si se conservan como corresponde, ser utilizados hasta las fechas de caducidad proporcionadas en las etiquetas. Los reactivos no se pueden utilizar después de la fecha de caducidad.

La dilución o alteración de los reactivos puede dar como resultado una pérdida de sensibilidad.

Evite la exposición de los reactivos a la luz intensa durante la conservación e incubación. Los reactivos deben estar firmemente cerrados tras su uso para evitar evaporación y contaminación.

Para abrir la bolsa de aluminio de la placa de microtitulación, corte la parte superior del lado marcado únicamente, para garantizar poder cerrarla de nuevo adecuadamente. No utilice las tiras si la bolsa de aluminio está dañada o si la bolsa con las tiras restantes y el desecante no ha sido cerrada de nuevo adecuadamente.

Utilice técnicas asépticas al retirar alícuotas de los tubos de reactivos para evitar la contaminación. Para evitar resultados falsos positivos, asegúrese de no entrar en contacto o salpicar las paredes superiores de los pocillos mientras se pipetea el conjugado. Tenga cuidado para no mezclar los tapones de los frascos y/o viales.

La reproducibilidad de los resultados de las pruebas es dependiente de una mezcla a fondo de los reactivos. Agite los matraces que contienen sueros control antes de usar también todas las muestras tras la dilución (por ejemplo, utilizando un mezclador de vórtice).

Asegúrese de pipetear con cuidado y respetar los tiempos y temperaturas de incubación proporcionados. Diferencias significativas de tiempos entre el pipeteo del primer y el último pocillo de la placa de microtitulación al dispensar muestras de sueros control, conjugado o sustrato pueden dar como resultado diferentes tiempos de preincubación, lo que puede influir en la precisión y reproducibilidad de los resultados.

Solamente se pueden lograr resultados óptimos si se siguen estrictamente las instrucciones.

El inmunoensayo SERION ELISA *classic* es válido únicamente si se cumplen los criterios de validación específicos del lote en el certificado de control de calidad.

Un lavado adecuado evita la falta de especificidad de la prueba. Por lo tanto, el procedimiento de lavado se debe llevar a cabo cuidadosamente. Todos los pocillos de fondo plano se deben rellenar con volúmenes iguales de solución amortiguadora de lavado. Al final del procedimiento asegúrese de que los pocillos no tienen nada de solución amortiguadora de lavado para evitar efectos de dilución no controlados. ¡Evite la formación de espuma!

Tenga cuidado para no dañar la inscripción (patógeno / clase de anticuerpo) en las tiras de prueba de microtitulación durante el lavado y aspiración para evitar confusiones.

## 7.2 Preparación y conservación de la muestra

Las muestras lipémicas, hemolíticas o ictericas (Suero o plasma) únicamente deben analizarse con precaución. No se deben realizar pruebas de muestras evidentemente contaminadas. El suero o plasma (EDTA, citrato, heparina) recogido de acuerdo con métodos normalizados de laboratorio son muestras apropiadas. Las muestras no deben estar inactivadas por temperatura.

### 7.2.1 Dilución de muestras

Antes de efectuar el análisis, las muestras del paciente ( $V_1$ ) se deben diluir en solución amortiguadora ( $V_2$ ) como sigue:

#### SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	añadir	10 $\mu$ l	de la muestra del paciente
	a	1000 $\mu$ l	solución amortiguadora de dilución

Tras la dilución y antes de pipetear a la placa de microtitulación, se deben mezclar a fondo las muestras para preparar una solución homogénea.

## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM

### Interferencia con factores reumatoides

Los factores reumatoides son autoanticuerpos, principalmente de la clase de las IgM, que se unen preferiblemente a complejos inmunes de IgG. La presencia de anticuerpos IgM no específicos (factores reumatoides) puede conducir a resultados falsos positivos en el inmunoensayo de IgM. Además, existe la posibilidad de que anticuerpos específicos de patógenos de baja afinidad de unión a IgM, puedan quedar desplazados por anticuerpos de mayor afinidad de unión a IgG conduciendo a un resultado falso negativo para IgM. Por lo tanto es necesario tratar previamente las muestras con un absorbente de factor reumatoide antes de la detección de IgM. (absorbente de factor reumatoide SERION, N° de pedido: Z200 (20 ml/100 pruebas)). La absorción Rf se realizará mediante incubación de la muestra del paciente en solución amortiguadora de dilución Rf durante 15 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. El procedimiento de la prueba se describe en un manual de instrucciones por separado.

Antes de efectuar el análisis, el material absorbente del factor reumatoide ( $V_1$ ) se debe diluir 1+4 en solución amortiguadora ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	añadir	200 $\mu$ l	Material absorbente de Rf
	a	800 $\mu$ l	solución amortiguadora de dilución

Las muestras del paciente ( $V_4$ ) se deben diluir en esta solución amortiguadora de dilución Rf ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	añadir	10 $\mu$ l	de la muestra del paciente
	a	1000 $\mu$ l	solución amortiguadora de dilución Rf

Tras la dilución y antes de pipetear a la placa de microtitulación, se deben mezclar a fondo las muestras para preparar una solución homogénea.

### 7.2.2 Conservación de las muestras

Las muestras del paciente no se deben conservar durante más de 7 días a 2 – 8 °C. Es posible ampliar la conservación a  $\leq -20$  °C. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras. Las muestras diluidas se pueden almacenar a 2 – 8 °C durante una semana.

### 7.3 Preparación de reactivos del kit

Lleve todos los reactivos hasta la temperatura ambiente antes de realizar las pruebas.

#### 7.3.1 Tiras de prueba de microtitulación

Las tiras de pruebas de microtitulación han sido envasadas junto con un desecante en una bolsa de aluminio. Extraiga del bastidor los huecos no necesarios y póngalos dentro de la bolsa de aluminio. Cierre cuidadosamente la bolsa para garantizar condiciones herméticas.

#### 7.3.2 Sueros control / sueros patrón

Los sueros control y patrón están listos para usar y no se deben diluir más. Para cada ejecución de las pruebas – independientemente del número de tiras de pruebas de microtitulación que se vayan a utilizar- se deben incluir los sueros control y patrón. Los sueros control deberán configurarse por duplicado.

No trate los sueros control con material absorbente de Rf.

#### 7.3.3 Conjugado FA de IgA, IgG o IgM anti-humana (listo para usar)

Los conjugados con la misma concentración y de la misma clase de inmunoglobulinas son intercambiables. Evite la contaminación de los conjugados listos para usar p.ej., utilizando puntas estériles.

#### 7.3.4 Solución de lavado

Diluya concentrado de solución amortiguadora de lavado ( $V_1$ ) 1:30 con agua destilada hasta un volumen final de  $V_2$ .

Ejemplo:

Concentrado de solución amortiguadora ( $V_1$ )	Volumen final ( $V_2$ )
33,3 ml	1.000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Solución amortiguadora de dilución para muestras (lista para usar)

#### 7.3.6 Sustrato (listo para usar)

Evite la contaminación de la solución de sustrato lista para usar p.ej., utilizando puntas estériles.

#### 7.3.7 Solución de parada (lista para usar)

## 7.4 Visión general - procedimiento de la prueba

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM cuantitativo

En caso de IgM detección absorción de factor reumatoide, ver N° 7.2.1;  
Incubación 15 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C

dilución de la muestra<sup>1</sup>  
(muestras del paciente)  
1+100

Pipetear muestras diluidas y control listo para usar/  
sueros patrón en los pocillos de micro análisis (100 µl)



INCUBACIÓN 60 Min./ 37 °C  
cámara de humectación



LAVAR (4 x 300 µl [DIL] [WASH] )<sup>2</sup>



Pipetear solución conjugado [APC] (100 µl)



INCUBACIÓN 30 Min./ 37 °C  
cámara de humectación



LAVAR (4 x 300 µl [DIL] [WASH] )<sup>2</sup>



Pipetear solución sustrato [pNPP] (100 µl)



INCUBACIÓN 30 Min./ 37 °C  
cámara de humectación



Pipetear solución parada [STOP] (100 µl)



LEER EXTINCIÓN a 405 nm

<sup>1</sup>Soluciones amortiguadoras de dilución especiales para las siguientes pruebas SERION ELISA *classic*:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Parvovirus B19 IgM y Hantavirus puumala IgG, IgM

<sup>2</sup>Para uso manual:

Ligeros golpecitos al final del procedimiento de lavado sobre toallita de papel.

## 7.5 Procedimiento manual

1. Coloque el número necesario de **pocillos en el bastidor** y prepare una hoja de protocolo.
2. Añada **100 µl de muestra diluida o controles listos para usar** en los pocillos apropiados de las tiras de prueba de microtitulación. Reserve un pocillo para el blanco del sustrato, p.ej.:

IgA/IgG/IgM cuantitativo	
Nº pocillo	
pocillo A1	Sustrato en blanco
pocillo B1	Control negativo
pocillo C1	Suero patrón
pocillo D1	Suero patrón
pocillo E1	1...del paciente

3. **Incubación de la muestra** durante 60 minutos (+/- 5 min) a 37 °C (+/- 1 °C) en la cámara de humectación
4. Tras la incubación **lave** todos los pocillos con solución de lavado (mediante dispositivo automatizado o manualmente):
  - aspire o agite la solución de incubación
  - llene cada pocillo con 300 µl de solución de lavado
  - aspire o agite la solución amortiguadora de lavado
  - repita el procedimiento de lavado 3 veces (¡en total son 4 veces!)
  - séquelo dando ligeros golpecitos a la placa de microtitulación sobre una toallita de papel
5. **Adición de conjugado**  
Añada 100 µl of del conjugado listo para usar IgA/IgG/IgM a los pocillos apropiados (excepto el sustrato en blanco)
6. **Incubación del conjugado** durante 30 minutos (+/- 1 min)\* a 37 °C (+/- 1 °C) en la cámara de humectación.
7. Tras la incubación **lave** todos los pocillos con solución de lavado (ver más arriba)
8. **Adición de sustrato**  
Añada 100 µl de solución de sustrato listo para usar a cada pocillo (¡incluyendo el pocillo para el sustrato en blanco!)
9. **Incubación del sustrato** durante 30 minutos (+/- 1 min)\* a 37 °C (+/- 1 °C) en la cámara de humectación.
10. **Parada de la reacción**  
Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo, agite suavemente la placa de microtitulación para mezclar.
11. **Lectura de la extinción**  
Lea la densidad óptica (DO) en los siguientes 60 minutos a 405 nm frente al sustrato blanco, la longitud de onda de referencia entre 620 nm y 690 nm (p.ej., 650 nm).

\*Se advierte que bajo condiciones de trabajo especiales internas del laboratorio pueden ser necesarias adaptaciones de los tiempos de incubación.

## 7.6 Procedimiento automatizado

SERION ELISA es apto para el procesado en equipos automáticos y ha sido evaluado para su uso con Immunomat™ así como con DYNEX DSX® y DS2®. El proceso automatizado se realiza de manera análoga al uso manual. Se advierte que bajo condiciones de trabajo especiales internas del laboratorio pueden ser necesarias adaptaciones de los tiempos de incubación.

## 7.7 Control positivo / control de exactitud

Para la verificación periódica del método de prueba, y para satisfacer los requisitos de los sistemas de gestión de calidad internos de laboratorio, recomendamos la utilización de SERION ELISA *controls* para determinar la precisión y fiabilidad de las cargas de pruebas SERION ELISA *classic*. La utilización de SERION ELISA *controls* se describe en manuales de instrucciones específicos.



## 8 EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Cuantificación de punto simple con el método 4PL

La asignación optimizada de las señales de extinción para valores cuantitativos se garantiza mediante la utilización de funciones no lineales, que se ajustan a una curva sigmoide sin ninguna transformación adicional a valores de DO. La determinación de las concentraciones de anticuerpo con SERION ELISA *classic* se lleva a cabo mediante el modelo logarítmico logístico de cuatro parámetros (4 PL) que es ideal para un ajuste exacto de las curvas. Está basado en la fórmula:

$$DO = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \text{En Conc.})}}$$

Los parámetros A, B, C, y D son representativos para la forma exacta de la curva:

- |                          |               |
|--------------------------|---------------|
| 1. asíntota inferior     | ⇒ parámetro A |
| 2. pendiente de la curva | ⇒ parámetro B |
| 3. punto de inflexión    | ⇒ parámetro C |
| 4. asíntota superior     | ⇒ parámetro D |

Para cada lote, la curva patrón es evaluada por el Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg, Alemania) en pruebas repetidas bajo condiciones óptimas.

No es necesaria una costosa y dilatada construcción de la curva estándar por el usuario.

Para la evaluación de concentraciones de anticuerpo se incluye una curva estándar específica del lote y también una tabla de evaluación específica del lote con cada kit de pruebas SERION ELISA *classic*. El software de evaluación SERION *evaluate*, así como el instrumento de software basado en Microsoft® Excel SERION *activity* están disponibles bajo petición.

Para compensar las variaciones normales de las pruebas y también para el control de la ejecución de las pruebas se utiliza un suero patrón en cada carga de pruebas individual. Para este suero control, se determina un valor de referencia con un intervalo de validez mediante el control de calidad del fabricante. Dentro de este intervalo está garantizada una correcta cuantificación de la concentración de anticuerpos.

## 8.2 Criterios de validez

- El blanco de sustrato debe ser  $< 0,25$  DO.
- El control negativo debe producir un resultado negativo de la prueba.
- Mediante el uso de pruebas cuantitativas SERION ELISA *classic* el valor de DO medio (¡después de restar el blanco de sustrato!) del suero patrón debe estar dentro del intervalo de validez, que se proporciona en el certificado de control de calidad específico del lote.
- La variación de valores DO del suero patrón no puede ser superior al 20 %.

Si no se cumplen estos criterios, la prueba no es válida y se debe repetir.

## 8.3 Cálculos del SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Evaluación no automatizada

Para la evaluación de la prueba SERION ELISA *classic* se incluye un certificado de control de calidad específico del lote con una curva patrón y una tabla de evaluación en el kit de pruebas de modo que los valores de DO obtenidos se pueden asignar a las correspondientes actividades de anticuerpo. El blanco de sustrato se debe restar de todos los valores de DO antes de la evaluación.

#### Método 1: Evaluación cualitativa

Para fijar los intervalos de corte multiplique el valor medio de la DO estándar medida con los datos numéricos del certificado de control de calidad (ver fórmulas de casos especiales), p.ej.:

$DO = 0,502 \times PM(STD)$  con corte superior

$DO = 0,352 \times PM(STD)$  con corte inferior

Si el valor de absorbancia medio medido del suero patrón es 0,64 DO, el intervalo de corte está entre 0,225-0,321 DO.

## Método 2:

Determinación continua de actividades de anticuerpo utilizando la curva estándar

Las así llamadas variaciones interensayo (desviaciones de un día a otro y de un laboratorio a otro) se compensan mediante la multiplicación del valor medido actual obtenido con una muestra del paciente con el factor de corrección F. este factor se calcula como sigue:

$$F = \frac{\text{Valor de referencia DO (de suero patrón)}}{\text{Valor actual DO (de suero patrón)}}$$

El procedimiento es necesario para ajustar el nivel actual de la prueba del usuario con la curva estándar específica del lote. En primer lugar, las desviaciones diarias tienen que ser corregidas calculando el factor de corrección F.

1. Se debe calcular la media de los dos valores DO del suero patrón y comprobar que se encuentra dentro del intervalo de validez dado.
2. Cálculo del factor F: el valor de referencia dado se divide por la media de la extinción del suero patrón:  
 $F = \text{valor referencia extinción suero STD} / \text{valor medio extinción suero STD}.$
3. Todos los valores medidos de las muestras de pacientes se multiplican por F.
4. Las actividades de anticuerpo en UI/ml o U/ml se pueden determinar a partir de la curva estándar con los valores corregidos.

### 8.3.2 Evaluación automática de la prueba con el software SERION *evaluate*

Después de la entrada de los cuatro parámetros y el valor de referencia del patrón de suero, las actividades de anticuerpos se calculan en línea a partir de cargas de pruebas SERION ELISA *classic* test procesadas y medidas mediante el software de evaluación SERION *evaluate*.

Si la densidad óptica del patrón está fuera del intervalo de validez, aparecerá el siguiente mensaje.

“Valores estándar fuera de intervalos en los siguientes grupos: grupo 1-24.” o

“El valor estándar difiere más del 20% en los siguientes grupos: grupo 1-24.”

En estos casos la ejecución de la prueba es inválida y debe repetirse.

Los parámetros y el valor de referencia deben ser modificados únicamente si existe un cambio de lote (la tabla de evaluación muestra parámetros y valores de referencia). La entrada correcta de los datos específicos del lote se puede comprobar basándose en la actividad del suero patrón (en UI/ml o U/ml) asignada al suero patrón. El valor medio calculado de las unidades debe corresponderse con el valor unitario indicado en el certificado específico del lote. Hay una corrección automática de los valores medidos. En la versión estándar el resultado muestra lo siguiente:

Código de la muestra Valor DO UI/ml o U/ml Evaluación
--

### 8.4 Límites de cuantificación

Los límites de cuantificación se especifican en el certificado de control de calidad de la prueba SERION ELISA *classic*. La linealidad de la dilución dentro de este intervalo ha sido demostrada en estudios de evaluación exhaustivos. En caso de que una muestra del paciente muestre un resultado de la prueba por encima del límite superior de cuantificación, se puede ensayar la prueba a una dilución mayor. La actividad de anticuerpo determinada así se debe multiplicar por el factor de dilución adicional.

### 8.5 Intervalos dudosos

Los intervalos dudosos de la prueba del SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA/IgG/IgM se especifican en el certificado de control de calidad e indican el intervalo para resultados dudosos de las pruebas. Los valores obtenidos, al analizar una muestra de un paciente, que caen por debajo de este intervalo indican un resultado negativo de la prueba; los valores por encima del intervalo dudoso se interpretan como positivos. En los casos en los que los resultados están dentro del intervalo dudoso no es posible una interpretación definitiva del resultado. En tales casos, se debe repetir la prueba en paralelo con una muestra de seguimiento tomada de 1 a 2 semanas más tarde (par de suero).

## 8.6 Interpretación de resultados

Resultados positivos en las pruebas de SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG, IgA e IgM indican la presencia de anticuerpos específicos dirigidos frente a *Helicobacter pylori*. Un resultado serológico positivo deberá siempre ser interpretado considerando los antecedentes del paciente y la situación clínica, puesto que un resultado positivo no distingue definitivamente entre el estado de una enfermedad actual y los anticuerpos debido a las tasas de seroprevalencia en la población general. Sin embargo, un resultado negativo indica un estado seronegativo en el paciente. En caso de sospecha clínica de una infección, dichos resultados negativos no descartan sin embargo la posibilidad de infección, puesto que la muestra puede haber sido tomada demasiado pronto para que los anticuerpos fuesen detectables. En tales casos, se deberá tomar otra muestra aproximadamente dos semanas más tarde.

La serología de *Helicobacter* no se debe realizar centrándose solamente en la detección de anticuerpos IgG puesto que la constelación de anticuerpos IgG negativo/IgA positivo se puede encontrar en del 2 al 7 % de los pacientes con infecciones agudas por *Helicobacter pylori*. Por otra parte, del 15 al 35 % de los pacientes con infecciones agudas por *Helicobacter pylori* no producen IgA específico del patógeno, haciendo que el diagnóstico sea posible únicamente mediante la detección de clases de inmunoglobulinas alternativas. Por lo tanto, la serología de ambas, IgG e IgA para *Helicobacter* se debe llevar a cabo simultáneamente. Las siguientes constelaciones de anticuerpos se pueden interpretar como sigue:

**Tabla 1: Interpretación de diversas constelaciones de anticuerpos en la serología de *Helicobacter***

IgM	IgA	IgG	interpretación
-	-	-	estado seronegativo, en caso de síntomas clínicos, se deberán tomar sueros control unas 2 semanas más tarde
+/-	-	+	estado seropositivo tras el contacto con el antígeno o infección activa con falta de respuesta a IgG,
-	-	+	seroprevalencia dependiente de la edad del paciente ("contagio")
+/-	+	+	infección activa sospechada con <i>H. pylori</i> ; patrón de reacción típico en pacientes con gastritis (activa)
+/-	+	-	Infección activa sospechada con <i>H.pylori</i> , falta de respuesta a IgG (2-7% de los casos)

## 8.7 Intervalos de referencia de individuos sanos

Las pruebas de sueros de donantes de sangre elegidos al azar, recogidos en la región del sur de Alemania, con las pruebas de SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, IgG e IgM dieron como resultado la distribución siguiente. De 47 sueros ensayados con la prueba de SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, 39 (83,0 %) fueron negativos, cinco sueros (10,6 %) dieron una reacción positiva y tres sueros (6,4 %) fueron considerados dudosos. De 47 sueros, 41 (87,2 %) fueron negativos cuando se ensayaron con la prueba de SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG, cuatro (8,5 %) sueros arrojaron un resultado positivo y dos (4,3 %) fueron evaluados como dudosos. Además, los resultados del ensayo de 47 sueros en la prueba de SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM fueron como sigue; 35 sueros (74,5 %) ensayados fueron negativos, seis (12,8 %) positivos y seis (12,8 %) sueros fueron de resultado dudoso.

## 9 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

### 9.1 Sensibilidad y especificidad

#### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG:

Para establecer las características de funcionamiento del SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG se examinaron un total de 88 sueros. De éstos, 41 eran donantes de sangre al azar y 47 sueros de pacientes con infección por *Helicobacter* sospechada por resultados de pruebas anteriores. Los sueros fueron ensayados en el SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgG y en dos ELISA adicionales disponibles comercialmente proporcionando los siguientes datos de funcionamiento.

SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgG	Sensibilidad	Especificidad
Datos de funcionamiento frente a ELISA 1	96,6 %	94,3 %
Datos de funcionamiento frente a ELISA 2	91,1 %	> 99 %

Además, la AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) llevó a cabo un estudio externo en Francia. Éste consistió en el examen de un total de 92 sueros. 44 de 45 muestras de pacientes con infección probada por *Helicobacter* fueron correctamente identificados por la prueba SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori mientras que un suero fue identificado como dudoso. 42 de 47 muestras de suero provenientes de individuos probadamente no infectados fueron registradas como negativas, 2 como dudosas y tres sueros fueron falsos positivos. Estos resultados apoyan los resultados del estudio interno. La información detallada sobre los resultados de este estudio externo está disponible en <http://www.afssaps.fr>

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA:

Para evaluar el SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA se ensayó un total de 146 muestras. El suero grupo 1 consistió en 54 sueros de donantes de sangre al azar mientras que el suero grupo 2 contenía 87 sueros de pacientes de gastroscopia cuyas pruebas del material de biopsia resultaron positivas para ureasa (prueba CLO) y fueron caracterizados como positivos para *H. pylori* basándose en pruebas histológicas. Además, se examinaron 5 sueros de pacientes con anticuerpos frente a *Campylobacter jejuni* busca de reacciones cruzadas.

Las muestras fueron ensayadas en el SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA en comparación con cuatro pruebas ELISA adicionales disponibles comercialmente (pruebas A a D). Los resultados discrepantes (es decir, cualquier suero que no produjo el mismo resultado en al menos 4 de las 5 pruebas ELISA) se evaluaron utilizando una prueba de inmunocoagulación comercial.

#### Resultados: Suero grupo 1:

Prueba	Correlación	Prevalencia	Sensibilidad	Especificidad
SERION ELISA <i>classic</i>	96,0 %	20,0 %	80,0 %	100 %
ELISA A	93,0 %	16,3 %	100 %	91,7 %
ELISA B	93,9 %	20,4 %	80,0 %	97,4 %
ELISA C	84,3 %	19,6 %	20,0 %	100 %
ELISA D	95,7 %	19,1 %	88,9 %	97,4 %

Un total de diez sueros fueron determinados como positivos. Ocho sueros fueron positivos en la prueba SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori y los ELISA B y D. El ELISA A fue la prueba más sensible, sin embargo tres sueros quedaron en la región dudosa y no se utilizaron en el cálculo estadístico. No hubo diferencias significativas en los cálculos de prevalencia.

#### Resultados: Suero grupo 2:

Prueba	Correlación	Prevalencia	Sensibilidad	Especificidad
SERION ELISA <i>classic</i>	91,3 %	59,4 %	85,4 %	100 %
ELISA A	82,2 %	67,1 %	100 %	45,8 %
ELISA B	88,9 %	61,1 %	81,8 %	100 %
ELISA C	86,3 %	65,0 %	78,8 %	100 %
ELISA D	89,5 %	63,2 %	83,3 %	100 %

En los SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA y los ELISA B-D, 28 sueros recogidos secuencialmente fueron evaluados como definitivamente negativos. En el ELISA A 13 de estos sueros produjeron resultados positivos. La prevalencia indica la proporción de resultados positivos dentro de los grupos de suero. La sensibilidad calculada es menor que cuando se comparó con el ELISA de IgG. Esto es en parte debido a que la respuesta inmune de IgA se dirige principalmente frente a las proteínas CagA y ureasa B de *H.pylori* mientras que la respuesta de IgG se dirige frente al complemento de proteína completo del organismo.

Las diferencias observadas en las respuestas de anticuerpos IgG e IgA unido al hecho de que la proteína ureasa B es principalmente responsable de una unión anticuerpos no específica, es una razón probable de la correlación baja de las determinaciones de IgA y, en particular, de que la comparación de ELISA y la inmunocoagulación sea solamente posible en parte. Este estudio enfatiza la importancia de la detección de anticuerpos IgA en el diagnóstico de las infecciones por *H. pylori* y demuestra una prevalencia de 2 a 5 veces superior de anticuerpos IgA en pacientes con infección confirmada (supergrupo 2) que cuando se comparó con la población normal (suero grupo 1). No se observaron reacciones cruzadas en SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA con *Campylobacter jejuni* (se ensayaron cinco sueros). Éste también fue el caso de los ELISA B a mientras que en el ELISA A se registró un suero como positivo.

Cuando se incluyen los 146 sueros las características de funcionamiento calculadas para SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA son una sensibilidad del 84,3 % y una especificidad del 100 % con un resultado para la mejor correlación del 93,5 %. Solamente el ELISA A tuvo una sensibilidad del 100 % y esto fue a costa de una baja especificidad del 73,8 %. Los ELISA B y D son comparables a la prueba SERION ELISA *classic* con sensibilidades del 81,5 % y 84,2 % y especificidades del 98,6 % y 100 %. El ELISA C tuvo la peor sensibilidad con 69,4 % (100 % de especificidad).

### **SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM**

Para evaluar el SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM se ensayó un total de 186 muestras provenientes de adultos. El suero grupo 1 consistió en 45 sueros de donantes de sangre al azar mientras que el suero grupo 2 contenía 119 sueros con infección demostrada. Un tercer panel de suero, el suero grupo 3, consistió en seis sueros de pacientes con anticuerpos frente a *Campylobacter jejuni*, siete seropositivos para *Chlamydia spec*, tres con anticuerpos para *Borrelia burgdorferi*, tres con anticuerpos para *Legionella pneumophila*, uno con anticuerpos para *Brucella spec*. y 10 sueros con elevada actividad del factor reumatoide.

Las muestras fueron ensayadas en el SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM en comparación con dos pruebas ELISA adicionales disponibles comercialmente. Mientras que solamente se dispuso de dos pruebas comparables de ELISA de calidad adecuada y no hubo ninguna prueba de inmunocoagulación disponible, los resultados positivos se ensayaron adicionalmente en pruebas ELISA de IgG e IgA. Para determinar la sensibilidad y la especificidad, se realizó una comparación directa con la prueba comercial y SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM.



El 3,2 % de las muestras de suero (6/186) reaccionaron positivamente en al menos la prueba SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM y en otra prueba ELISA, igualmente seis de los sueros ensayados fueron del resultado dudoso en por lo menos un ELISA adicional. La literatura publicada internacionalmente indica una tasa positiva de IgM en la población general del 1 % al 11 %, que los resultados en este estudio respaldan. En total se evaluaron 98 (140) sueros como negativo en todos los ELISA (por lo menos en dos ELISA). Esto se compara con 52,7 % (75,3 %). Ninguna muestra reaccionó como positiva en las tres pruebas ELISA aunque siete reaccionaron como resultado dudoso en al menos dos ELISA (3,8 %). En total, por lo menos 59 sueros (31,7 %) reaccionaron con resultado dudoso en al menos una prueba. Teniendo en cuenta los 186 sueros, el SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM en comparación con otros dos ELISA proporcionó una sensibilidad del 100 % y comparado con el ELISA A una especificidad del 80,1 % (correlación 80,3 %) y con el ELISA B una especificidad del 75,5 % (correlación 76 %). La reducción de las sensibilidades resulta del hecho de que ninguna de las pruebas de comparación reconoció a ninguno de los sueros como positivos, de modo que establecer una comparación de sensibilidades entre estas dos pruebas es imposible. Si únicamente se incluyen los 45 sueros de donantes de sangre en los cálculos, la sensibilidad de si la correlación resulta aproximadamente el 10 % superior. Es de destacar que los 25 sueros de donantes de sangre fueron evaluados anteriormente y designados como positivos en estudios anteriores. En 17 de 119 pacientes, se registraron resultados positivos de pruebas independientes. El ELISA A registró junto con el SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM un total de un suero positivo y el ELISA B cinco. Los anticuerpos IgM están acompañados frecuentemente por anticuerpos IgG.

## 9.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad intraensayo se determinó mediante ensayo de sueros de diferentes reactividades 20 veces en una carga de pruebas. La reproducibilidad interensayo se determinó mediante ensayo de sueros de diferentes reactividades 10 veces en 10 ensayos independientes realizados en 5 días diferentes.

$$\text{Coeficiente de variación (CV \%)} = \frac{\text{Desviación típica}}{\text{Valor de la media}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgA:

Muestra	Valor de la media (DO)	Intraensayo (CV %)	Valor de la media (DO)	Interensayo (CV %)
negativo	0,499	3,4	0,467	9,9
dudoso	0,627	4,6	0,580	10,0
fuertemente positivo	1,263	3,6	1,286	7,7

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgG:

Muestra	Valor de la media (DO)	Intraensayo (CV %)	Valor de la media (DO)	Interensayo (CV %)
dudoso	0,442	4,5	0,423	13,8
fuertemente positivo	1,513	2,4	1,514	11,0
fuertemente positivo	1,615	3,1	1,599	9,8

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgM:


Muestra	Valor de la media (DO)	Intraensayo (CV %)	Valor de la media (DO)	Interensayo (CV %)
dudoso	0,342	5,8	0,346	13,0
dudoso	0,371	4,7	0,385	9,9
positivo	0,658	5,5	0,661	9,2

## 10 MEDIDAS DE SEGURIDAD

### 10.1 Declaraciones de advertencia

El SERION ELISA *classic* está diseñado para ser utilizado por personal cualificado y familiarizado con las buenas prácticas de laboratorio.

Todos los reactivos del kit y las muestras humanas deben manipularse con cuidado, de acuerdo a la buena práctica de laboratorio establecida.

- Este kit contiene componentes de sangre humana. Aunque todos los sueros de control y de corte han sido analizados y el resultado ha sido negativo para anti-HIV-ab (anticuerpo anti VIH), HBs-Ag (*antígeno de superficie del virus de hepatitis B*) y anti-HCV-ab (anticuerpo anti VHC), se deberán considerar como potencialmente infecciosos.
- No pipetear con la boca.
- No fume, coma ni beba en zonas en las que se manipulen muestras o reactivos del kit.
- Utilice guantes desechables, bata de laboratorio y gafas de seguridad mientras manipula reactivos del kit o muestras. Lávese las manos a fondo después.
- El material del paciente y demás material potencialmente infeccioso se debe descontaminar después de la ejecución de la prueba.
- Los reactivos se deben conservar de modo seguro y deben ser inaccesibles a un acceso no autorizado p.ej., niños.
- Solución de parada:  corrosivo (C); produce quemadura ácida (R34)

¡Utilice gafas de seguridad, guantes y bata de laboratorio al manipular!

### 10.2 Eliminación

Cumpla con los requisitos reglamentarios pertinentes.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Blaser, M. J. (1998) *Helicobacter pylori* and associated diseases. *BMJ* 316, 1507-10.
- [2] Heilmann, K. L., Borchard, F. (1991) Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrastructural findings. *GUT* 32, 137-40.
- [3] Kosunen, T. U. *et al.* (1992) Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339, 893-95.
- [4] Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori – Von der Grundlage zur Therapie* Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage, 11-23.
- [5] Malfertheiner, P. *et al.* (1997) Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Eur. J. Gastroent. Hep.* 9, 1-2.
- [6] Malfertheiner, P. *et al.* (1998) *Helicobacter pylori* Infektionen und Ulkuserkrankungen. *Chirurg* 69, 239-48.
- [7] Malfertheiner, P. (2004) *Helicobacter pylori* Infection – ein Update 2004. *Deutsch-Medicinische Wochenschrift* 129, 1821-6.
- [8] The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG, 1997): Current European concepts in the Management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut* 41, 8-13.
- [9] Warren, J. R., Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-5.
- [10] Xiang, Z., *et al.* (1995) Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63, 94.
- [11] Yamaoka, Y. *et al.* (1999) Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* 52, 215-8.



# Αναπροσαρμογές

Παρακαλώ δώστε προσοχή στις διαφορές σε σύγκριση με την προηγούμενη έκδοση.

Τρέχουσα έκδοση Αριθμ.: V 13.11/12-1

Προηγούμενη έκδοση: V 12.10/01-1

Αναπροσαρμογή στην παράγραφο: Γενική αναπροσαρμογή, 5, 7.2.1

## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

### ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

- 1 ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ
- 2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΧΕΤΙΚΟΤΗΤΑ
- 3 ΑΡΧΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA *classic*
- 4 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ
- 5 ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ
- 6 ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ
- 7 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA *classic*
  - 7.1 Ενδείξεις ελάττωσης ποιότητας
  - 7.2 Προετοιμασία δείγματος και φύλαξη
  - 7.3 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων του κιτ
  - 7.4 Επισκόπηση - Διαδικασία δοκιμασίας
  - 7.5 Χειροκίνητη διαδικασία δοκιμασίας
  - 7.6 Αυτόματη διαδικασία δοκιμασίας
  - 7.7 Θετικός έλεγχος/ Έλεγχος ακρίβειας
- 8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ
  - 8.1 Ποσοτικό προσδιορισμός με τη μέθοδο 4PL
  - 8.2 Κριτήρια ισχύος δοκιμασίας
  - 8.3 Υπολογισμός SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Όρια ποσοτικού προσδιορισμού
  - 8.5 Εύρος οριακών τιμών
  - 8.6 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων
  - 8.7 Εύρος αναφοράς υγιών ατόμων
- 9 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
  - 9.1 Ευαισθησία και Ειδικότητα
  - 9.2 Επαναληψιμότητα
- 10 ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ
  - 10.1 Προειδοποιήσεις/ Προφυλάξεις
  - 10.2 Διάθεση
- 11 ΑΝΑΦΟΡΕΣ



## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

### Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για ανίχνευση ανθρώπινων αντισωμάτων για διαγνωστική χρήση *in vitro*

SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgA	Αριθμ. Παραγγελίας: ESR118A
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgG	Αριθμ. Παραγγελίας: ESR118G
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgM	Αριθμ. Παραγγελίας: ESR118M

#### 1 ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Οι δοκιμασίες SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, IgG και IgM είναι ποσοτικές και ποιοτικές ανοσολογικές μέθοδοι για την ανίχνευση ανθρώπινων αντισωμάτων στο ορό ή το πλάσμα, τα οποία κατευθύνονται ενάντια στο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Η ξεχωριστή ανίχνευση εξατομικευμένων κατηγοριών ανοσοσφαιρινών προσφέρει επιβεβαίωση της επαφής με το παθογόνο και τον προσδιορισμό της κατάστασης της νόσου.

#### 2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΧΕΤΙΚΟΤΗΤΑ

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού είναι ένα Gram- αρνητικό, σπειροειδές βακτηρίδιο, το οποίο από μεγάλη κινητικότητα λόγω ότι κατέχει έως και 7 βλεφαρίδια. Η μικροβιολογική του ανίχνευση βασίζεται στις δοκιμασίες θετικής ουρίας, καταλάσης και οξειδάσης, καθώς επίσης και την απουσία υδρόλυσης της ιππουρικής και της αναγωγής του νιτρικού.

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού είναι ένα πολύ εξειδικευμένο βακτηρίδιο όσον αφορά τον ξενιστή του. Άλλα είδη *ελικοβακτηριδίου* υπάρχουν σε διάφορα θηλαστικά, όπως σε γάτες, σκύλους, χοίρους και ποντίκια

Οι διαφορές του φαινότυπου μεταξύ των ειδών του *ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* αφορούν αποκλειστικά την έκφραση/ μη έκφραση μίας κενοτοπιώδους κυτοτοξίνης (vacuolating Cytotoxin, VacA) και μίας δεύτερης τοξίνης, η οποία κωδικοποιείται από γονίδια που σχετίζονται με κυτοξίνες (Cytotoxin-Associated Gene, CagA). Λόγω αυτών των φαινομενικών διαφορών διακρίνουμε τις λοιμογόνες (τύπος I) και μη λοιμογόνες (τύπος II) κατηγορίες του ελικοβακτηριδίου.

Οι ασθενείς με έλκη του δωδεκαδακτύλου προσβάλλονται πολύ συχνότερα από τον τύπο I του ελικοβακτηριδίου που εκφράζει VacA και CagA. Υπάρχουν ωστόσο μελέτες, οι οποίες δε βρίσκουν πιθανή τη σχέση μεταξύ λοίμωξης με ελικοβακτηρίδιο και το σύνδρομο που σχετίζεται με τον καρκίνο του στομάχου, με τα είδη των ελικοβακτηριδίων που εκφράζουν VacA και CagA.

Ο μηχανισμός μετάδοσης του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού από άνθρωπο σε άνθρωπο δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Η δημοσιευμένη βιβλιογραφία αναφέρει ως σύνηθες τη μετάδοση από στόμα σε στόμα και από τα κόπρανα στο στόμα. Οι λοιμώξεις με ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού χωρίζονται σε δύο βασικές ομάδες τις οξείες και χρόνιες με 80 έως 90 % όλων των περιπτώσεων γαστρίτιδας που είναι ανιχνεύσιμες σε λοίμωξη με ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού.

Ασθένειες που σχετίζονται με λοιμώξεις από *ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* (π.χ. αυτές οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε γαστρίτιδα που έχει προκληθεί από *H. pylori*) είναι έλκος δωδεκαδακτύλου (95 %), έλκος στομάχου (90 %) και το λέμφωμα MALT (60-70 %). Τα άτομα που πάσχουν από τις χρόνιες λοιμώξεις από *ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* έχουν εξαπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν λέμφωμα MALT σε σχέση με τα υγιή άτομα.

Γίνεται διαχωρισμός μεταξύ μη επεμβατικών και επεμβατικών μεθόδων κατά τη διάγνωση των λοιμώξεων του *H. pylori*. Επεμβατικές είναι οι διαδικασίες όπως η ιστολογική, η ταχεία δοκιμασία ουρεάσης (π.χ. δοκιμασία CLO), μικροβιολογικές τεχνικές όπως είναι η καλλιέργεια και οι δοκιμασίες μοριακής βιολογίας (PCR). Η δοκιμασία εισπνοής C<sup>13</sup> και η ορολογική εξέταση ανήκουν στις μη επεμβατικές μεθόδους.

Οι Ευρωπαϊκές συστάσεις για τη θεραπεία λοιμώξεων του *ελικοβακτηρίδιου του πυλωρού* καθορίστηκαν από την Ευρωπαϊκή Ομάδα Μελέτης Ελικοβακτηριδίου πυλωρού (EHPSG) στη σύσκεψη του “Maastricht-Consensus” το 1997. Συνιστάται η θεραπεία εκρίζωσης, «τριπλή θεραπεία» για όλους τους θετικούς για *ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* ασθενείς με έλκη. Περαιτέρω θα πρέπει να εξετάζονται όλα τα άτομα που υποφέρουν από δυσπεψία, ακόμη και χωρίς σημαντικά συμπτώματα, και είναι κάτω των 45 ετών, με μη επεμβατικές μεθόδους, όπως π.χ. ορολογικά, στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα πρέπει να χορηγείται και σε αυτά τα άτομα θεραπευτική αγωγή

Η ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της θεραπείας μετά από τη θεραπεία εκρίζωσης. Σε αυτήν την περίπτωση, θα πρέπει να περάσουν τουλάχιστον έξι μήνες πριν καταγραφούν τέτοιοι τίτλοι αντισωμάτων ώστε οι μετρήσεις ελέγχου να ανιχνεύσουν επιβεβαιωμένες μεταβολές του τίτλου. Ειδικά στην περίπτωση αντισωμάτων IgG, μία πιθανή παραμονή για αρκετούς μήνες ή ακόμα και έτη πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και επομένως, ο έλεγχος με μεμονωμένα ορολογικά αποτελέσματα είναι περιορισμένος. Η μη επεμβατική δοκιμασία αναπνοής C<sup>13</sup> συνιστάται για πρόσθετο έλεγχο.

Λοιμώξεις που σχετίζονται με το *ελικοβακτηρίδιο* πρέπει να αξιολογούνται σε εμφανή σχέση με την ηλικία των ασθενών. Η εμφάνιση ανά δεκαετία ζωής αυξάνεται κατά 10 % στις βιομηχανικές χώρες, από τη Βόρεια Αμερική στην Κεντρική Ευρώπη. Η συνολική εμφάνιση στον πληθυσμό σε αυτήν την περιοχή είναι 40 %.

### 3 ΑΡΧΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA classic

Το ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) είναι μία ανοσολογική μέθοδος, η οποία είναι ειδικά προσαρμοσμένη για τον προσδιορισμό αντισωμάτων στο πεδίο της λοιμωξιολογικής ορολογίας. Η αντίδρασης βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους. Οι ταινίες της δοκιμασίας SERION ELISA classic πλάκα μικροπιλοποίησης είναι επικαλυμμένες με ειδικά αντιγόνα του παθογόνου ενδιαφέροντος. Εάν υπάρχουν αντισώματα στον ορό του δείγματος του ασθενή, αυτά συνδέονται με το σταθερό αντιγόνο. Ένα δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο έχει συμπλεγθεί με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, ανιχνεύει και συνδέεται με το ανοσολογικό σύμπλεγμα. Το άχρωμο υπόστρωμα p-νιτροφαινολοφωσφορικό μετατρέπεται έπειτα στο έγχρωμο προϊόν p-νιτροφαινόλη. Η ένταση του σήματος αυτού του προϊόντος αντίδρασης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα και μετράται φωτομετρικά.



#### 4 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ

Συστατικά της δοκιμασίας	Τεμάχια / Όγκος
<b>Αποσπάσιμες ταινίες δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης με οκτώ επικαλυμμένες με αντιγόνο μεμονωμένες κοιλότητες.</b> (συνολικά 96) <b>[MTP]</b> , 1 πλαίσιο δοκιμασίας. Το υλικό επικάλυψης είναι απενεργοποιημένο.	12 τεμάχια
<b>Πρότυπος ορός (έτοιμος προς χρήση) <b>[STD]</b>,</b> Ανθρώπινος ορός σε πρωτεϊνούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, αρνητικό για αντίσωμα αντι-HIV, αντιγόνο HBs (αντιγόνο επιφάνειας ηπατίτιδας Β) και αντίσωμα αντι-HCV; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, χρωστική: Αμαράνθη Ο.	2 x 2 ml
<b>Αρνητικός ορός ελέγχου (έτοιμος προς χρήση) <b>[NEG]</b>,</b> Ανθρώπινος ορός σε πρωτεϊνούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, αρνητικό για αντίσωμα αντι-HIV, αντιγόνο HBs (αντιγόνο επιφάνειας ηπατίτιδας Β) και αντίσωμα αντι-HCV; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, χρωστική: Πράσινη λισσαμίνη V.	2 ml
<b>Αντι-ανθρώπινη IgA, IgG ή IgM σύζευξη (έτοιμη προς χρήση) <b>[APC]</b>,</b> Αντι ανθρώπινο IgA, IgG ή IgM πολυκλωνικό αντίσωμα, συζευγμένο σε αλκαλική φωσφατάση, σταθεροποιημένο σε πρωτεϊνούχο διάλυμα, συντηρητικό: 0.01 % μεθυλισοθειαζολιόνη, 0.01 % βρωμονιτροδιοξάνιο.	13 ml
<b>Συμπύκνωμα διαλύματος πλύσης (επαρκές για 1000 ml) <b>[WASH]</b>,</b> Χλωριούχο νάτριο με Tween 20 και 30 mM Tris/HCl, pH 7,4; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου,	33,3 ml
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης <b>[DILB]</b>,</b> Πρωτεϊνούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με Tween 20; συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, χρωστική: 0.01 g/l κυανού της βρωμοφαινόλης.	2 x 50 ml
<b>Διάλυμα διακοπής <b>[STOP]</b>,</b> 1.2 N υδροξείδιο του νατρίου	15 ml
<b>Υπόστρωμα (έτοιμο προς χρήση) <b>[pNPP]</b>,</b> Παρα-νιτροφαινολοφωσφορικό σε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς διαλύτη, συντηρητικό: < 0.1 % αζίδιο νατρίου, (Το υπόστρωμα είναι δυνατό να έχει μία ελαφρώς κίτρινη απόχρωση στην κλειστή φιάλη, πράγμα το οποίο δε μειώνει την ποιότητα του προϊόντος!)	13 ml
<b>Δίπλωμα ελέγχου ποιότητας με πρότυπη καμπύλη και πίνακα τιμών <b>[INFO]</b>,</b> (ποσοτικός προσδιορισμός αντισωμάτων σε IU/ml ή U/ml).	2 σελίδες

## 5 ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ

- κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός
- για την ανίχνευση IgM: απορροφητικό Rf SERION, αριθμ. παραγγελίας Z200 (20 ml)
- φωτόμετρο για πλάκες μικροτιτλοποίησης με φίλτρο, μήκος κύματος 405 nm, συνιστώμενο μήκος κύματος αναφοράς 620 nm - 690 nm (π.χ. 650 nm)
- επωαστήρας 37 °C
- θάλαμος υγρασίας
- αποσταγμένο νερό
- Συνδετήρες Click (αριθμ. παραγγελίας VT120)

## 6 ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Αντιδραστήριο	Φύλαξη	Σταθερότητα
Ταινίες μικροτιλοποίησης (επικαλυμμένες με αντιγόνο)	κλειστό  μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C σε κλειστό περιέκτη αλουμινίου με αποξηραντικό μέσο  <i>Ταινίες οι οποίες δε χρησιμοποιούνται πρέπει να φυλάσσονται στον κλειστό περιέκτη αλουμινίου σε ξηρό περιβάλλον.</i>	βλέπε ημερομηνία λήξης,  ελάχιστη διάρκεια ζωής τέσσερις εβδομάδες  διάρκεια ζωής σε περίπτωση ορθής χρήσης και φύλαξης μέχρι την ημερομηνία λήξης
Οροί ελέγχου / Πρότυποι οροί	΄μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C	βλέπε ημερομηνία λήξης,  24 μήνες από την παραγωγή
Σύζευξη	έτοιμο προς χρήση διάλυμα στους 2 – 8 °C <i>Αποφύγετε την μόλυνση π.χ. με τη χρήση αποστειρωμένων άκρων προχοϊδων.</i>	βλέπε ημερομηνία λήξης,  28 μήνες από την παραγωγή
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	Κλειστό  ΄μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C  Απορρίψτε θολά διαλύματα.	βλέπε ημερομηνία λήξης,  36 μήνες από την παραγωγή  24 μήνες
Διάλυμα πλύσης	Συμπύκνωμα μετά το άνοιγμα στους 2 – 8 °C αραιώση εργασίας στους 2 – 8 °C αραιώση εργασίας σε θερμοκρασία δωματίου Οι φιάλες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αραιώση εργασίας θα πρέπει να καθαρίζονται τακτικά. Απορρίψτε θολά διαλύματα.	βλέπε ημερομηνία λήξης,  2 εβδομάδες  1 εβδομάδα
Υπόστρωμα	έτοιμο προς χρήση διάλυμα στους 2 – 8 °C, φυλάσσεται προστατευμένο από το φως <i>Αποφύγετε την μόλυνση π.χ. με τη χρήση αποστειρωμένων άκρων προχοϊδων.</i>  Απορρίψτε εάν το διάλυμα χρωματιστεί κίτρινο (απορρόφηση έναντι αποσταγμένου ύδατος . > 0.25 OD).	βλέπε ημερομηνία λήξης,  36 μήνες από την παραγωγή
Διάλυμα διακοπής	Μετά από το άνοιγμα σε θερμοκρασία δωματίου	βλέπε ημερομηνία λήξης,

## 7 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ SERION ELISA *classic*

### 7.1 Ενδείξεις ελάττωσης ποιότητας

Να χρησιμοποιείτε μόνο αντιδραστήρια SERION ELISA *classic* όταν χρησιμοποιείτε τις ανοσολογικές δοκιμασίες SERION ELISA *classic*. Τα συστατικά στοιχεία δεν πρέπει να αντικαθιστώνται από αντιδραστήρια άλλων κατασκευαστών. Οι πρότυποι οροί και οι οροί ελέγχου των ανοσολογικών δοκιμασιών SERION ELISA *classic* έχουν οριστεί ειδικά για το κιτ δοκιμασίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με άλλες παρτίδες. Το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης, το διάλυμα πλύσης, το υπόστρωμα και το διάλυμα διακοπής μπορούν να χρησιμοποιηθούν με όλες τις ανοσολογικές δοκιμασίες SERION ELISA *classic* ανεξαρτήτως παρτίδας και δοκιμασίας.

Υπάρχουν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις σύζευξης για κάθε κατηγορία ανοσοσφαιρίνης: ΧΑΜΗΛΗ, ΜΕΣΗ, ΥΨΗΛΗ Η ταξινόμηση αναγράφεται σε κάθε ετικέτα ως εξής:

π.χ.	IgG +	χαμηλής συγκέντρωσης σύζευξη IgG
	IgG ++	μέσης συγκέντρωσης σύζευξη IgG
	IgG +++	υψηλής συγκέντρωσης σύζευξη IgG

σε σπάνιες περιπτώσεις απαιτείται η χρήση ειδικής σύζευξης ώστε να εξασφαλίζεται η σταθερή ποιότητα των προϊόντων μας. Οι ειδικές συζεύξεις παράγονται σε ανεξάρτητη παρτίδα και δεν φέρουν το σήμα “+” και δεν ανταλλάσσονται με άλλες συζεύξεις.

Παρακαλώ δώστε ιδιαίτερη προσοχή στις πληροφορίες που αναγράφονται στις ετικέτες!

Σε κλειστή συσκευασία, όλα τα συστατικά στοιχεία των δοκιμασιών SERION ELISA *classic*, μπορούν, όταν φυλάσσονται αναλόγως, να χρησιμοποιηθούν μέχρι και την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στις ετικέτες. Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά από την ημερομηνία λήξης.

Αραίωση εναλλαγή των αντιδραστηρίων είναι δυνατό να προκαλέσουν απώλεια της ευαισθησίας.

Αποφύγετε την έκθεση των αντιδραστηρίων σε έντονο φως κατά τη διάρκεια της φύλαξης και επώασης. Τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται καλά κλεισμένα μετά από τη χρήση, ώστε να αποφεύγονται η εξάτμιση και η μόλυνσή τους.

Για να ανοίξετε τον περιέκτη αλουμινίου της πλάκας μικροτιτλοποίησης κόψτε μόνο την κορυφή στη σηματοδοτημένη πλευρά, ώστε να μπορεί να ξανακλείσει κατάλληλα. Μη χρησιμοποιείτε τις ταινίες εάν ο περιέκτης αλουμινίου έχει υποστεί βλάβη ή εάν ο περιέκτης με τις υπολειπόμενες ταινίες δεν έχει ξανακλείσει σωστά.

Χρησιμοποιείτε άσηπτες τεχνικές όταν απομακρύνετε τμήματα από τους σωληνίσκους αντιδραστηρίων ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση. Για να αποφευχθούν ψευδώς θετικά

αποτελέσματα, εξασφαλίστε ότι δεν ακουμπάτε ή πιπιλάτε τα άνω τοιχώματα των κοιλοτήτων κατά το πιπετάρισμα της σύζευξης. Προσέχετε να μη ανταλλάσετε τα καπάκια των φιαλών και/ ή φιαλιδίων.

Η δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας εξαρτάται από τη λεπτομερή μίξη των αντιδραστηρίων . Ανακινείστε τις φιάλες που περιέχουν τους ορούς ελέγχου πριν από τη χρήση και επίσης όλα τα δείγματα μετά από την αραίωση (π.χ. με τη χρήση ενός αναμίκτη vortex).

Βεβαιωθείτε ότι πιπετάρετε προσεκτικά και σύμφωνα με τους δεδομένους χρόνους και τις θερμοκρασίες επώασης . Σημαντικές χρονικές διαφορές μεταξύ του πιπεταρίσματος της πρώτης και της τελευταίας κοιλότητας της πλάκας μικροπιλοποίησης όταν διανέμονται δείγματα και οροί ελέγχου, η σύζευξη ή το υπόστρωμα είναι δυνατό να οδηγήσουν σε διαφορετικούς χρόνους προεπώασης, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια και τη δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων.

Τα βέλτιστα αποτελέσματα μπορούν να επιτευχθούν μόνο εάν τηρούνται αυστηρά οι οδηγίες.

Η ανοσολογική μέθοδος SERION ELISA *classic* ισχύει μόνο εάν εκπληρώνονται τα ειδικά για την παρτίδα κριτήρια επικύρωσης στο πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου.

Η επαρκής πλύση αποφεύγει τις μη ειδικεύσεις της δοκιμασίας. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία πλύσης θα πρέπει να διεξάγεται προσεκτικά. Όλες οι κοιλότητες στον επίπεδο πυθμένα θα πρέπει να πληρώνονται με όμοιους όγκους ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Στο τέλος της διαδικασίας εξασφαλίστε ότι οι κοιλότητες είναι πλήρως ελεύθερες από ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης προκειμένου να αποφευχθούν ανεξέλεγκτες επιδράσεις αραίωσης. Αποφύγετε τη δημιουργία αφρού!

Δώστε προσοχή να μην προκαλέσετε βλάβη στην επιγραφή (παθογόνο/ κατηγορία αντισωμάτων) στις ταινίες δοκιμασίας μικροπιλοποίησης κατά τη διάρκεια της πλύσης και αναρρόφησης ώστε να αποφευχθεί η σύγχυση.

## **7.2 Προετοιμασία δείγματος και φύλαξη**

Λιπαιμικά, αιμολυμένα ή ικτερικά δείγματα (ορός ή πλάσμα) θα πρέπει να δοκιμάζονται μόνο με προσοχή. Τα προφανώς μολυσμένα δείγματα δεν πρέπει να δοκιμάζονται. Ο ορός ή το πλάσμα (EDTA, κιτρικό άλας, ηπαρίνη) που συλλέγονται σύμφωνα με τις πρότυπες εργαστηριακές μεθόδους είναι κατάλληλα δείγματα. Τα δείγματα δεν πρέπει να απενεργοποιούνται θερμικά.

### 7.2.1 Αραίωση των δειγμάτων

Πριν τη διενέργεια της δοκιμασίας, τα δείγματα του ασθενή ( $V_1$ ) πρέπει να αραιώνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ( $V_2$ ) ως εξής:

#### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	προσθήκη	10 $\mu$ l	δείγμα ασθενή
	σε κάθε	1000 $\mu$ l	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης

Μετά από την αραίωση πριν το πιπετάρισμα στην πλάκα μικροτιτλοποίησης πρέπει τα δείγματα πρέπει να αναμιγνύονται καλά, ώστε να προκύπτει ένα ομοιογενές διάλυμα.

#### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM

##### Αλληλεπίδραση με τους ρευματοειδής παράγοντες

Οι ρευματοειδής παράγοντες είναι αυτοαντισώματα, κυρίως της ομάδας IgM, τα οποία συνδέονται κατά προτίμηση με τα IgG σε ανοσολογικά συμπλέγματα. Η παρουσία μη ειδικών αντισωμάτων IgM (ρευματοειδής παράγοντες) είναι δυνατό να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα στη δοκιμασία IgM. Επιπλέον, υπάρχει η πιθανότητα, αυτά τα ασθενώς συνδεδεμένα ειδικά παθογόνα αντισώματα IgM να εκτοπιστούν από ισχυρότερα δεσμευμένα αντισώματα IgG οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα IgM. Επομένως είναι απαραίτητο να επεξεργάζονται εκ των προτέρων τα δείγματα με απορροφητή του ρευματοειδή παράγοντα πριν από την ανίχνευση IgM (Απορροφητής ρευματοειδή παράγοντα (SERION, Αριθμ. παραγγελίας: Z200 (20 ml/100 δοκιμασίες)). Η απορρόφηση Rf (ρευματοειδή παράγοντα) εκτελείται μέσω επώασης του δείγματος του ασθενή σε ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή κατά τη διάρκεια της νύχτας σε 4 °C. Η διαδικασία της δοκιμασίας περιγράφεται σε ένα ξεχωριστό εγχειρίδιο οδηγιών.

Πριν τη διενέργεια της δοκιμασίας, ο απορροφητής ρευματοειδή παράγοντα ( $V_1$ ) πρέπει να αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ( $V_2$ ):

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	προσθήκη	200 $\mu$ l	Απορροφητής Rf
	σε κάθε	800 $\mu$ l	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης

Τα δείγματα ασθενών ( $V_4$ ) πρέπει να αραιώνονται σε αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα Rf ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	προσθήκη	10 $\mu$ l	δείγμα ασθενή
	σε κάθε	1000 $\mu$ l	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης

Μετά από την αραίωση πριν το πιπετάρισμα στην πλάκα μικροτιτλοποίησης πρέπει τα δείγματα πρέπει να αναμιγνύονται καλά, ώστε να προκύπτει ένα ομοιογενές διάλυμα.

### 7.2.2 Φύλαξη δειγμάτων

Τα δείγματα ασθενών δεν πρέπει να φυλάσσονται πάνω από 7 ημέρες στους 2 – 8 °C. Παρατεταμένη φύλαξη είναι δυνατή ≤ -20 °C. Αποφύγετε επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη των δειγμάτων. Αραιωμένα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους 2 – 8 °C για μία εβδομάδα.

### 7.3 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων του kit

Προσαρμόστε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη δοκιμασία.

#### 7.3.1 Ταινίες δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης

Οι ταινίες δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης σε πλαίσια είναι συσκευασμένες με ένα αποξηραντικό μέσο σε έναν περιέκτη αλουμινίου. Πάρτε τις μη απαιτούμενες κοιλότητες από το πλαίσιο και τις επανατοποθετήστε τις στον περιέκτη αλουμινίου. Κλείστε τον περιέκτη προσεκτικά για να εξασφαλίσετε αεροστεγείς συνθήκες.

#### 7.3.2 Οροί ελέγχου / Πρότυποι οροί

Οι οροί ελέγχου και οι πρότυποι οροί είναι έτοιμοι προς χρήση και δεν πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω. Για κάθε κύκλο δοκιμασίας – ανεξαρτήτως του αριθμού ταινιών δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης που χρησιμοποιούνται – πρέπει να συμπεριλαμβάνονται οι οροί ελέγχου και οι πρότυποι οροί. Οι πρότυποι οροί πρέπει να τοποθετούνται εις διπλούν .

Μην επεξεργάζεστε τους ορούς ελέγχου με απορροφητή Rf (ρευματοειδή παράγοντα).

#### 7.3.3 Αντι-ανθρώπινη IgA, IgG ή IgM σύζευξη AP (έτοιμη προς χρήση),

Συζεύξεις με την ίδια συγκέντρωση και της ίδιας κατηγορίας ανοσοσφαιρινών είναι ανταλλάξιμες. Αποφύγετε τη μόλυνση συζεύξεων έτοιμες προς χρήση π.χ. χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα άκρα (προχοϊδων).

#### 7.3.4 Διάλυμα πλύσης

Αραιώστε το συμπύκνωμα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ( $V_1$ ) 1:30 με αποσταγμένο νερό σε τελικό όγκο  $V_2$ .

Παράδειγμα:

Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος ( $V_1$ )	Τελικός όγκος ( $V_2$ )
33,3 ml	1.000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης για δείγματα (έτοιμο προς χρήση)

#### 7.3.6 Υπόστρωμα (έτοιμο προς χρήση)

Αποφύγετε τη μόλυνση διαλυμάτων υποστρώματος έτοιμα προς χρήση π.χ. χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα άκρα (προχοϊδων).

#### 7.3.7 Διάλυμα διακοπής (έτοιμο προς χρήση)

## 7.4 Επισκόπηση - Διαδικασία δοκιμασίας

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM ποσοτική

Σε περίπτωση ανίχνευσης IgM απορρόφηση ρευματοειδή παράγοντα, βλέπε αριθμ. 7.2.1;  
Επώαση 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C

αραίωση δείγματος dilution<sup>1</sup>  
(δείγματα ασθενών)  
1+100

Πιπετάρετε αραιωμένα δείγματα και έτοιμο προς χρήση ορό ελέγχου/  
πρότυπο ορό στις κοιλότητες της μικροδοκιμασίας (100 μl)



ΕΠΩΑΣΗ 60 Min./ 37 °C  
θάλαμος υγρασίας



ΠΛΥΣΗ (4 x 300 μl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Πιπετάρετε διάλυμα σύζευξης [APC] (100 μl)



ΕΠΩΑΣΗ 30 Min./ 37 °C  
θάλαμος υγρασίας



ΠΛΥΣΗ (4 x 300 μl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Πιπετάρετε διάλυμα υποστρώματος [pNPP] (100 μl)



ΕΠΩΑΣΗ 30 Min./ 37 °C  
θάλαμος υγρασίας



Πιπετάρετε διάλυμα διακοπής [STOP] (100 μl)



ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ στα 405 nm

<sup>1</sup>Ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα αραίωσης για τις παρακάτω δοκιμασίες SERION ELISA *classic*:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Παρβοϊός B19 IgM και ιός Hanta Puumala IgG, IgM

<sup>2</sup>Για χειροκίνητη χρήση:  
χτυπήστε την πλάκα στο τέλος της διαδικασίας πλύσης σε μία χαρτοπετσέτα.



## 7.5 Χειροκίνητη διαδικασία δοκιμασίας

1. Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό **κοιλοτήτων στο πλαίσιο** και προετοιμάστε ένα φύλλο πρωτοκόλλου .
2. Προσθέστε από **100 μl αραιωμένου δείγματος ή έτοιμο προς χρήση έλεγχο** στις κατάλληλες κοιλότητες των ταινιών της δοκιμασίας μικροτιτλοποίησης. Αφήστε μία κοιλότητα κενή για το υπόστρωμα, π.χ. .:

IgA/IgG/IgM ποσοτική Κοιλότητα αριθμ.	
κοιλότητα A1	Υπόστρωμα ελεύθερο
Κοιλότητα B1	Αρνητικός έλεγχος
Κοιλότητα C1	Πρότυπος ορός
Κοιλότητα D1	Πρότυπος ορός
Κοιλότητα E1	Ασθενής 1....

3. **Επώαση δείγματος** για 60 λεπτά (+/- 5 min) στους 37 °C (+/- 1 °C) σε θάλαμο υγρασίας
4. Μετά από την επώαση **πλύνετε** όλες τις κοιλότητες με διάλυμα πλύσης (με αυτόματο πλύσης ή χειροκίνητα).
  - αναρροφήστε ή αδειάστε με ανακίνηση το διάλυμα επώασης.
  - γεμίστε κάθε κοιλότητα με 300 μl διάλυμα πλύσης
  - αναρροφήστε ή αδειάστε με ανακίνηση το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.
  - επαναλάβετε τη διαδικασία πλύσης 3 φορές (συνολικά 4 φορές!)
  - στεγνώστε χτυπώντας την πλάκα μικροτιτλοποίησης σε μία χαρτοπετσέτα
5. **Προσθήκη της σύζευξης**  
Προσθέστε 100 μl από την έτοιμη προς χρήση σύζευξη IgA/IgG/IgM στις κατάλληλες κοιλότητες (εξαίρεση κενό υποστρώματος)
6. **Επώαση σύζευξης** για 30 λεπτά (+/- 1 min) στους 37 °C (+/- 1 °C) σε θάλαμο υγρασίας
7. Μετά από την επώαση **πλύνετε** όλες τις κοιλότητες με διάλυμα πλύσης (βλέπε παρακάτω)
8. **Προσθήκη του υποστρώματος**  
Προσθέστε 100 μl έτοιμο προς χρήση διάλυμα υποστρώματος σε κάθε κοιλότητα (συμπεριλαμβανομένου κενό υποστρώματος!)
9. **Επώαση υποστρώματος** για 30 λεπτά (+/- 1 min) στους 37 °C (+/- 1 °C) σε θάλαμο υγρασίας
10. **Διακοπή της αντίδρασης**  
Προσθέστε 100 μl διάλυμα διακοπής σε κάθε κοιλότητα, ανακινείστε ελαφρά την πλάκα μικροτιτλοποίησης για ανάμιξη.
11. **Ανάγνωση απορρόφησης**  
Διαβάστε την οπτική πυκνότητα (OD) εντός 60 λεπτών στα 405 nm έναντι κενού υποστρώματος, μήκος κύματος αναφοράς μεταξύ 620 nm και 690 nm (π.χ. 650 nm).

\* Παρακαλώ λάβετε υπόψη ότι υπό ειδικές συνθήκες εργασίας, ίσως να είναι απαραίτητες εσωτερικές εργαστηριακές προσαρμογές.

## 7.6 Αυτόματη διαδικασία δοκιμασίας

Το SERION ELISA είναι προσαρμοσμένο για την επεξεργασία σε αυτόματα μηχανήματα και ρυθμισμένα για τη χρήση με Immunomat <sup>TM</sup> καθώς επίσης και με DYNEX DSX<sup>®</sup> και DS2<sup>®</sup>. Η αυτόματη διαδικασία είναι ανάλογα σχεδιασμένη με τη χειροκίνητη χρήση. Παρακαλώ λάβετε υπόψη ότι υπό ειδικές συνθήκες εργασίας, ίσως να είναι απαραίτητες εσωτερικές εργαστηριακές προσαρμογές.

## 7.7 Θετικός έλεγχος/ Έλεγχος ακρίβειας

Για την περιοδική επαλήθευση της μεθόδου δοκιμασίας, προκειμένου να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις συστημάτων διαχείρισης εσωτερική εργαστηριακής ποιότητας, συνιστούμε τη χρήση ελέγχων SERION ELISA *controls* για τον καθορισμό ακρίβειας και αξιοπιστίας των κύκλων δοκιμασίας SERION ELISA *classic*. Η χρήση ελέγχων SERION ELISA *controls* περιγράφεται σε ειδικά εγχειρίδια οδηγιών.

## 8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Ποσοτικό προσδιορισμός με τη μέθοδο 4PL

Η βελτιστοποιημένη απονομή σημάτων απορρόφησης στις ποσοτικές τιμές εξασφαλίζεται με τη χρησιμοποίηση μη γραμμικών λειτουργιών, οι οποίες ρυθμίζουν μια σιγμοειδή καμπύλη χωρίς περαιτέρω μετασχηματισμό στις τιμές οπτικής πυκνότητας (OD). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων αντισωμάτων με το SERION ELISA *classic* διενεργείται με το μοντέλο λογιστικής 4 παραμέτρων (4 PL) το οποίο είναι ιδανικό για την ακριβή προσαρμογή της καμπύλης. Βασίζεται στον τύπο:

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{Conc.})}}$$

Οι παράμετροι A, B, C, και D είναι αντιπροσωπευτικές για την ακριβή μορφή της καμπύλης:

- |                          |                |
|--------------------------|----------------|
| 1. χαμηλότερη ασύμπτωτος | ⇒ παράμετρος A |
| 2. κλίση της καμπύλης    | ⇒ παράμετρος B |
| 3. σημείο καμπής         | ⇒ παράμετρος C |
| 4. ανώτερη ασύμπτωτος    | ⇒ παράμετρος D |

Για κάθε παρτίδα η πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται από το Ινστιτούτο Virion\Serion ΕΠΕ (Würzburg, Γερμανία) σε επαναλαμβανόμενους κύκλους δοκιμασίας υπό ιδανικές συνθήκες. Δεν απαιτείται κατανάλωση χρόνου και πολύ δαπανηρή κατασκευή πρότυπης καμπύλης από το χρήστη.

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων αντισωμάτων μίας ειδικής για την παρτίδα πρότυπης καμπύλης καθώς επίσης και ενός ειδικού για την καμπύλη πίνακα υπολογισμού συμπεριλαμβάνονται σε κάθε κιτ δοκιμασίας SERION ELISA *classic*. Το λογισμικό υπολογισμού SERION *evaluate* όπως και το εργαλείο λογισμικού της Microsoft® βασισμένο σε Excel, SERION *activity* διατίθενται κατόπιν αιτήσεως.

Για την εξισορρόπηση των φυσιολογικών εναλλαγών της δοκιμασίας και για τον έλεγχο της ποιότητας του κύκλου της δοκιμασίας χρησιμοποιείται σε κάθε μεμονωμένο κύκλο δοκιμασίας ένας πρότυπος ορός. Για αυτόν τον ορό ελέγχου προσδιορίζεται μία τιμή αναφοράς με εύρος ισχύος στον ποιοτικό έλεγχο του κατασκευαστή. Εντός αυτών των ορίων εξασφαλίζεται ο ορθός ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης αντισωμάτων.

## 8.2 Κριτήρια ισχύος δοκιμασίας

- Το κενό υπόστρωμα πρέπει να είναι  $< 0.25$  OD.
- Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να παράγει αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας.
- Κατά τη χρήση ποσοτικών δοκιμασιών SERION ELISA *classic* η μέση τιμή OD (μετά από την αφαίρεση του κενού υποστρώματος!) του πρότυπου ορού πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους ισχύος, το οποίο ορίζεται στο πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου ειδικό για την παρτίδα.
- Η μεταβολή των τιμών OD του πρότυπου ορού ή δεν μπορεί να είναι υψηλότερη από 20 %.

Εάν δεν τηρούνται αυτά τα κριτήρια, η δοκιμασία δεν έχει ισχύ και πρέπει να επαναλαμβάνεται.

## 8.3 Υπολογισμός SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Μη- αυτόματος υπολογισμός

Για τον υπολογισμό της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* ένα πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου ειδικό για την παρτίδα με πρότυπη καμπύλη και έναν πίνακα υπολογισμού συμπεριλαμβάνεται στο κιτ δοκιμασίας έτσι ώστε οι αποκτηθείσες τιμές OD μπορούν να οριστούν στις αντίστοιχες δραστηριότητες αντισωμάτων. Το κενό υποστρώματος πρέπει να αφαιρείται από όλες τις τιμές OD πριν από τον υπολογισμό.

#### Μέθοδος 1: Ποιοτικός υπολογισμός

Για τον καθορισμό του εύρους cut-off πολλαπλασιάζεται η μέση τιμή της μετρημένου πρότυπης OD με τα αριθμητικά στοιχεία του πιστοποιητικού ποιοτικού ελέγχου (βλ. τους ειδικούς τύπους περίπτωσης), π.χ.:

OD =  $0.502 \times MW(STD)$  με ανώτερο cut-off

OD =  $0,352 \times MW(STD)$  με χαμηλότερο cut-off

Εάν η μετρημένη μέση αξία απορρόφησης του πρότυπου ορού είναι 0,64 OD, το εύρος του cut-off είναι μεταξύ 0.225-0.321 OD.

## Μέθοδος 2:

Συνεχής προσδιορισμός δραστηριοτήτων αντισωμάτων χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη

Οι αποκαλούμενες παραλλαγές διαδοκιμασίας (αποκλίσεις ημέρα με την ημέρα και αποκλίσεις από εργαστήριο σε εργαστήριο) αντισταθμίζονται με τον πολλαπλασιασμό της τρέχουσας μετρημένης αξίας που λαμβάνεται από το δείγμα ενός ασθενή με τον παράγοντα διορθώσεως F. Αυτός ο παράγοντας υπολογίζεται ως εξής :

$$F = \frac{\text{OD-τιμή αναφοράς (του πρότυπου ορού)}}{\text{OD-τρέχουσα τιμή (του πρότυπου ορού)}}$$

Η διαδικασία είναι απαραίτητη για να ρυθμιστεί το τρέχον επίπεδο δοκιμασίας του χρήστη με την πρότυπη καμπύλη, ειδική για την παρτίδα. Αρχικά, πρέπει οι καθημερινές αποκλίσεις να διορθώνονται υπολογίζοντας το διορθωτικό παράγοντα F.

1. Ο μέσος όρος των δύο τιμών OD του πρότυπου ορού πρέπει να υπολογίζεται και να επιβεβαιώνεται ότι βρίσκεται εντός του δεδομένου εύρους ισχύος.
2. Υπολογισμός του παράγοντα F: Η δεδομένη τιμή αναφοράς διαιρείται με τη μέση τιμή της απορρόφησης του πρότυπου ορού:  
 $F = \text{τιμή αναφοράς απορρόφησης STD ορού} / \text{μέση τιμή απορρόφησης STD ορού}.$
3. Όλες οι μετρημένες τιμές των δειγμάτων ασθενή πολλαπλασιάζεται με τον παράγοντα F.
4. Οι δραστηριότητες αντισωμάτων σε IU/ml ή U/ml μπορούν να προσδιοριστούν από την πρότυπη καμπύλη με τις διορθωμένες τιμές.

### 8.3.2 Αυτόματος υπολογισμός δοκιμασίας με λογισμικό SERION *evaluate*

Μετά από την εισαγωγή των τεσσάρων παραμέτρων και την τιμή αναφοράς του πρότυπου ορού, οι δραστηριότητες αντισωμάτων υπολογίζονται on-line από επεξεργασμένη και μετρημένη δοκιμασία SERION ELISA *classic*, που τρέχει με τον υπολογισμό από το λογισμικό SERION *evaluate*.

Εάν η οπτική πυκνότητα του προτύπου είναι εκτός του εύρους ισχύος, εμφανίζεται το παρακάτω μήνυμα.

„Πρότυπες τιμές εκτός εύρους στις ακόλουθες ομάδες: Ομάδα 1-24.” ή

„Η πρότυπη τιμή διαφέρει περισσότερο από 20 % στις ακόλουθες ομάδες: Ομάδα 1-24.”

Σε αυτές τις περιπτώσεις ο κύκλος δοκιμασίας είναι άκυρος και πρέπει να επαναληφθεί.

Οι παράμετροι και η τιμή αναφοράς πρέπει να μεταβάλλεται μόνο όταν υπάρχει αλλαγή παρτίδας (πίνακας υπολογισμού εμφανίζει παραμέτρους και τιμές αναφοράς). Η σωστή εισαγωγή ειδικών για την παρτίδα στοιχείων μπορεί να ελεγχθεί στη βάση της δραστηριότητας του πρότυπου ορού (σε IU/ml ή U/ml) σύμφωνα με τον πρότυπο ορό. Η υπολογισμένη μέση τιμή των μονάδων πρέπει να αντιστοιχεί στη αξιολόγηση που εμφανίζεται στο ειδικό για την παρτίδα πιστοποιητικό. Υπάρχει αυτόματη διόρθωση των μετρημένων τιμών. Στην πρότυπη εκδοχή εκτύπωσης εμφανίζεται το εξής:

Κωδικός δείγματος τιμή OD IU/ml ή U/ml Υπολογισμός
---

### 8.4 Όρια ποσοτικού προσδιορισμού

Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού καθορίζονται στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας της δοκιμασίας SERION ELISA *classic*. Η γραμμικότητα της αραίωσης εντός του εύρους έχει καταδειχτεί σε περιεκτικές μελέτες υπολογισμού. Σε περίπτωση που ένα δείγμα ασθενή παρουσιάζει αποτέλεσμα δοκιμασίας πάνω από το ανώτερο όριο του ποσοτικού προσδιορισμού, το δείγμα θα πρέπει να εξεταστεί σε υψηλότερη αραίωση. Η με αυτόν τον τρόπο καθορισμένη δραστηριότητα αντισωμάτων πρέπει να πολλαπλασιάζεται με τον πρόσθετο παράγοντα αραίωσης.

### 8.5 Εύρος οριακών τιμών

Το εύρος οριακών τιμών της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM καθορίζονται στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας και εμφανίζουν το εύρος για τα οριακά αποτελέσματα της δοκιμασίας. Οι τιμές οι οποίες προκύπτουν κατά τη δοκιμασία του δείγματος ενός ασθενή, που μειώνονται κάτω από αυτό το όριο εμφανίζουν ένα αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας, τιμές επάνω από το όριο των οριακών τιμών ερμηνεύονται ως θετικές. Σε περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός των ορίων των οριακών τιμών, δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η δοκιμασία θα πρέπει να επαναλαμβάνεται παράλληλα με ένα δείγμα παρακολούθησης, το οποίο λαμβάνεται μία με δύο εβδομάδες αργότερα από τον ασθενή (ζεύγος δείγματος).

## 8.6 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Θετικά αποτελέσματα στις δοκιμασίες SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgG, IgA και IgM tests* δείχνουν την παρουσία ειδικών αντισωμάτων ενάντια του *ελικοβακτηριδίου του πυλωρού*. Ένα θετικό ορολογικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται πάντα σε σχέση με το ιατρικό ιστορικό του ασθενή και την κλινική του εικόνα, λόγω το ότι το θετικό αποτέλεσμα δεν διακρίνει υποχρεωτικά μεταξύ ενεργούς νόσου και ορολογικής επικράτησης χωρίς κλινικά ευρήματα στο γενικό πληθυσμό. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα ωστόσο δείχνει μία αρνητική ορολογική κατάσταση του ασθενή. Σε περίπτωση κλινικής υποψίας λοίμωξης τέτοια αρνητικά αποτελέσματα ωστόσο, δεν αποκλείουν την πιθανότητα λοίμωξης, δεδομένου ότι το δείγμα μπορεί να έχει ληφθεί πολύ νωρίς, ώστε τα αντισώματα να είναι ανιχνεύσιμα. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να γίνει νέα λήψη δείγματος μετά από 2 εβδομάδες.

Η ορολογία του ελικοβακτηριδίου δεν θα πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στον εντοπισμό των ειδικών αντισωμάτων IgG, λόγω το ότι ο συνδυασμός των αντισωμάτων IgG αρνητικό/IgA θετικό μπορεί να εμφανίζεται στο 2-7 % των ασθενών με οξεία λοίμωξη με το *ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού*. Από την άλλη πλευρά δεν αναπτύσσει το 15-35 % των ασθενών με οξεία λοίμωξη με το ελικοβακτηρίδιο ειδικά αντισώματα IgA και επομένως είναι δυνατόν ο ορολογικός καθορισμός μόνο μέσω των άλλων κατηγοριών ανοσοσφαιρίνης. Για αυτούς τους λόγους θα πρέπει η ορολογία όσον αφορά το ελικοβακτηρίδιο να γίνεται σχεδόν ταυτόχρονα στις κατηγορίες IgG και IgA. Οι παρακάτω συνδυασμοί αντισωμάτων μπορούν να ερμηνευτούν ως εξής:

**Πίνακας 1: Ερμηνείες διάφορων συνδυασμών αντισωμάτων στην ορολογία του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.**

IgM	IgA:	IgG:	Ερμηνεία
-	-	-	Οροαρνητική κατάσταση, σε περίπτωση κλινικών συμπτωμάτων, οι οροί ελέγχου θα πρέπει να λαμβάνονται 2 εβδομάδες αργότερα.
+/-	-	+	Οροθετική κατάσταση μετά από επαφή με το αντιγόνο ή ενεργής λοίμωξης και απουσία ανταπόκρισης IgG
-	-	+	Επικράτηση ορού εξαρτώμενη από την ηλικία του ασθενή („επιμόλυνση“)
+/-	+	+	Υποψία για ενεργή λοίμωξη με <i>ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού</i> , χαρακτηριστική αντίδραση ασθενών με (ενεργή) γαστρίτιδα
+/-	+	-	Υποψία ενεργής λοίμωξης με <i>ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού</i> και απουσία ανταπόκρισης IgG (2-7% των περιπτώσεων)

## 8.7 Εύρος αναφοράς υγιών ατόμων

Δοκιμασία τυχαίων ορών αιμοδοτών, που συλλέχθηκαν στη νότια Γερμανία, με δοκιμασίες SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgA, IgG και IgM* έδωσαν αποτελέσματα στην εξής κατανομή. Από 47 ορούς που δοκιμάστηκαν με τη δοκιμασία SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgA*, 39 (83,0 %) ήταν αρνητικά, πέντε οροί (10,6 %) αντέδρασαν θετικά και τρεις οροί (6,4 %) βρέθηκαν οριακοί. Από τους 47 ορούς, 41 (87,2 %) ήταν αρνητικοί όταν δοκιμάστηκαν με τη δοκιμασία SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgG*, τέσσερις (8,5 %) οροί παρήγαγαν θετικό αποτέλεσμα και 2 (4,3 %) αξιολογήθηκαν ως οριακοί. Πρόσθετα, τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία 47 ορών στη δοκιμασία SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgM* ήταν ως εξής: 35 οροί (74,5 %) δοκιμάστηκαν αρνητικοί, έξι (12,8 %) θετικοί και έξι (12,8 %) οροί ήταν οριακοί.

## 9 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### 9.1 Ευαισθησία και Ειδικότητα

#### SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgG*:

Προκειμένου να καθοριστούν τα χαρακτηριστικά απόδοσης για το SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgG*, εξετάστηκαν συνολικά 88 οροί. Από αυτούς 41 ήταν τυχαίοι αιμοδοτές και 47 οροί ασθενών με πιθανή λοίμωξη *ελικοβακτηριδίου* που στηρίχθηκε σε αποτελέσματα προηγούμενης δοκιμασίας. Οι οροί δοκιμάστηκαν με SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgG* και επιπλέον με δύο εμπορικά διαθέσιμα ELISA ώστε να ληφθούν τα ακόλουθα δεδομένα απόδοσης .

SERION ELISA <i>classic Helicobacter pylori IgG</i>	Ευαισθησία	Εξειδίκευση
Δεδομένα απόδοσης έναντι ELISA 1	96.6 %	94.3 %
Δεδομένα απόδοσης έναντι ELISA 2	91.1 %	> 99 %

Επιπλέον, διενεργήθηκε μία εξωτερική μελέτη από την AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) στη Γαλλία.

Αυτό αποτελούταν από την εξέταση συνολικά 92 ορών. 44 από 45 δείγματα από ασθενείς με επιβεβαιωμένη λοίμωξη με *ελικοβακτηρίδιο* αναγνωρίστηκαν ορθώς από τη δοκιμασία SERION ELISA *classic Helicobacter pylori*, ενώ ένας ορός αναγνωρίστηκε ως οριακός. 42 από 47 δείγματα ορού από επιβεβαιωμένα άτομα χωρίς λοίμωξη, καταγράφηκαν ως αρνητικά, 2 ως οριακά και τρία ήταν ψευδώς θετικά. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τα αποτελέσματα της εσωτερικής μελέτης. Λεπτομερείς αποτελέσματα αυτής της εξωτερικής μελέτης είναι διαθέσιμα στη σελίδα <http://www.afssaps.fr>



## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA:

Για την αξιολόγηση του SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA δοκιμάστηκαν συνολικά 146 δείγματα ορού. Η ορολογική ομάδα 1 αποτελείται από 54 τυχαίους ορούς αιμοδοτών ενώ η ορολογική ομάδα 2 αποτελείται από 87 ορούς ασθενών, οι οποίοι εξετάστηκαν με γαστροσκόπηση και το υλικό βιοψίας τους βρέθηκε θετικό στην ουρεάση (δοκιμασία CLO) και χαρακτηρίστηκαν ως θετικοί στο *ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* βάσει ιστολογικών δοκιμασιών. Επιπλέον, 5 δείγματα ορών από ασθενείς με αντισώματα στο *Campylobacter jejunii* εξετάστηκαν για διασταυρούμενες αντιδράσεις.

Τα δείγματα εξετάστηκαν με το SERION ELISA *classic* Helicobacter IgA σε σύγκριση με τέσσερα επιπλέον εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ELISA (δοκιμασίες A έως D). Ανακόλουθα αποτελέσματα (δηλ. οροί οι οποίοι δεν παράγουν το ίδιο αποτέλεσμα για τουλάχιστον 4 από τις 5 δοκιμασίες ELISA), αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας μία εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία ανοσοσύτωσης.

### Αποτελέσματα: Ορολογική ομάδα 1:

Δοκιμασία	Συσχετισμός	Εμφάνιση	Ευαισθησία	Εξειδίκευση
SERION ELISA <i>classic</i>	96.0 %	20.0 %	80.0 %	100 %
ELISA A	93.0 %	16.3 %	100 %	91.7 %
ELISA B	93.9 %	20.4 %	80.0 %	97.4 %
ELISA C	84.3 %	19.6 %	20.0 %	100 %
ELISA D	95.7 %	19.1 %	88.9 %	97.4 %

Συνολικά δέκα οροί ανιχνεύτηκαν θετικοί. Οχτώ οροί ήταν θετικοί στη δοκιμασία SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori και στα ELISA B και D. Το ELISA A ήταν η πιο ευαίσθητη δοκιμασία, ωστόσο τρεις οροί ήταν στην οριακή περιοχή και δε χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στον υπολογισμό της εμφάνισης.

### Αποτελέσματα: Ορολογική ομάδα 2:

Δοκιμασία	Συσχετισμός	Εμφάνιση	Ευαισθησία	Εξειδίκευση
SERION ELISA <i>classic</i>	91.3 %	59.4 %	85.4 %	100 %
ELISA A	82.2 %	67.1 %	100 %	45.8 %
ELISA B	88.9 %	61.1 %	81.8 %	100 %
ELISA C	86.3 %	65.0 %	78.8 %	100 %
ELISA D	89.5 %	63.2 %	83.3 %	100 %

Με το SERION ELISA *classic Helicobacter IgA* και δοκιμασίες B - D, 28 από τους 87 ορούς παρακολούθησης βρέθηκαν σαφώς αρνητικοί. Στο ELISA A 13 οροί ήταν θετικοί. Η συχνότητα υποβάλλει το ποσοστό των θετικών αποτελεσμάτων μέσα στις ορολογικές ομάδες. Η υπολογισμένη ευαισθησία είναι χαμηλότερη όταν συγκρίνεται με το IgG ELISA. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην ανοσολογική απάντηση IgA, η οποία κατευθύνεται πρωτίστως ενάντια στο CagA και τις πρωτεΐνες ουρεάσης B τις του *ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* ενώ η απάντηση IgG κατευθύνεται ενάντια στην πλήρη πρωτεΐνη του συμπληρώματος του οργανισμού.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στην απάντηση IgA και IgG -αντισωμάτων καθώς επίσης και το γεγονός ότι η ουρεάση B-πρωτεΐνη είναι η κύρια αιτία της μη ειδικής σύνδεσης αντισωμάτων, μπορούν επίσης να είναι η βάση για το χαμηλό συσχετισμό στην ανίχνευση αντισωμάτων IgA. Επομένως η σύγκριση μεταξύ ELISA και ανοσοσύτωσης έχει περιορισμένη αξία. Αυτή η μελέτη καταδεικνύει επίσης τη σημασία της ανίχνευσης αντισωμάτων IgA για τη διάγνωση λοιμώξεων με *ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* και εμφανίζει 2-5 φορές υψηλότερη εμφάνιση των IgA -αντισωμάτων σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη λοίμωξη (ορολογική ομάδα 2) έναντι των ορών του κανονικού πληθυσμού (ορολογική ομάδα 1). Δεν εμφανίστηκαν διασταυρούμενες αντιδράσεις στο SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgA* προς το *Campylobacter jejuni* (πέντε οροί ελέγχου). Αυτό ισχύει και στα ELISA B έως D όπου στο ELISA A ένας ορός καταγράφηκε ως θετικός.

Εάν συμπεριληφθούν και οι 146 οροί, τα υπολογισμένα χαρακτηριστικά απόδοσης για το SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgA* έχουν ευαισθησία 84.3 % και ειδικότητα 100 % με καλύτερο αποτέλεσμα συσχετισμού της τάξης 93.5 %. Μόνο το ELISA A είχε ευαισθησία 100 % και αυτό εις βάρος μίας χαμηλής εξειδίκευσης ποσοστού 73.8 %. Τα ELISA B και D είναι συγκρίσιμα με τη δοκιμασία SERION ELISA *classic* με ευαισθησίες από 81.5 % και 84.2 % και εξειδικεύσεις των 98.6 % και 100 %. Το ELISA C είχε χειρότερη ευαισθησία με 69.4 % (100 % εξειδίκευση)

### **SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgM***

Για την αξιολόγηση του SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgM* δοκιμάστηκαν συνολικά 186 δείγματα ορού ενηλίκων. Η ορολογική ομάδα 1 αποτελούταν από 45 τυχαίους ορούς αιμοδοτών, ενώ η ομάδα 2 περιείχε 119 ορούς με εμφανή λοίμωξη. Μια τρίτη κατηγορία ορών, ορολογική ομάδα 3, αποτελούταν από έξι ορούς από ασθενείς με αντισώματα ενάντια του *Campylobacter jejuni*, επτά οροθετικούς σε είδη χλαμύδιας, τρεις με αντισώματα ενάντια στη *Borrelia burgdorferi*, τρεις με αντισώματα στη *Legionella pneumophila* antibodies, ένας με αντισώματα ενάντια σε είδη *Brucella spec.* και δέκα με αυξημένη δραστηριότητα του ρευματοειδή παράγοντα.

Τα δείγματα εξετάστηκαν με το SERION ELISA *classic Helicobacter IgM* σε σύγκριση με δύο επιπλέον εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ELISA. Ενώ ήταν διαθέσιμες μόνο δύο συγκρίσιμες δοκιμασίες ELISA επαρκούς ποιότητας και καμία δοκιμασία ανοσοσύτωσης, τα θετικά αποτελέσματα δοκιμάστηκαν πρόσθετα σε δοκιμασίες IgG και IgA ELISA. Για να οριστεί η ευαισθησία και εξειδίκευση, έγινε μία άμεση σύγκριση με την εμπορική δοκιμασία και το SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgM*.

3.2 % των δειγμάτων ορού (6/186) αντέδρασαν θετικά τουλάχιστον στο SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgM* και σε μία άλλη δοκιμασία ELISA, επιπλέον έξι από τους

ορούς που δοκιμάστηκαν βρέθηκαν σε ένα τουλάχιστον ακόμη ELISA οριακοί. Η διεθνή δημοσιευμένη βιβλιογραφία παρουσιάζει ένα θετικό ποσοστό IgM στο γενικό πληθυσμό της τάξης του 1 % έως 11 %, το οποίο υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα που παρατηρούνται σε αυτή τη μελέτη. Σε συνολικά 98 (140) ορούς υπολογίστηκαν ως αρνητικά σε όλα τα ELISA (τουλάχιστον σε δύο ELISA). Αυτό αντιστοιχεί σε 52.7 % (75.3 %). Κανένα δείγμα δεν αντέδρασε θετικά και στις τρεις δοκιμασίες ELISA αν και επτά αντέδρασαν οριακά σε τουλάχιστον δύο ELISA (3.8 %). Συνολικά, τουλάχιστον 59 οροί (31.7 %) αντέδρασαν οριακά σε τουλάχιστον μία δοκιμασία. Λαμβάνοντας υπόψη και τους 186 ορούς το SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgM* παρέχει σε σύγκριση με δύο άλλα ELISA ευαισθησία 100 % και σε σύγκριση με το ELISA A εξειδίκευση 80.1 % (συσχετισμός 80.3 %) και στο ELISA B εξειδίκευση 75.5 % (συσχετισμός 76 %). Οι μειωμένες ευαισθησίες προκύπτουν από το γεγονός ότι καμία από τις συγκρινόμενες δοκιμασίες δεν χαρακτήρισε κανέναν ορό θετικό, έτσι καθίσταται αδύνατη η σύγκριση των ευαισθησιών μεταξύ αυτών των δύο δοκιμασιών. Εάν συμπεριληφθούν μόνο 45 οροί αιμοδοτών στους υπολογισμούς, τότε οι ευαισθησίες και ο συσχετισμός βρίσκονται κάπου 10 % υψηλότερα. Πρέπει να σημειωθεί ότι 45 οροί αιμοδοτών υπολογίστηκαν και σχεδιάστηκαν προηγούμενα ως θετικοί σε παλαιότερες μελέτες. Σε 17 από 119 ασθενείς, καταγράφηκαν ανεξάρτητα θετικά αποτελέσματα. Το ELISA A κατέγραψε μαζί με το SERION ELISA *classic Helicobacter pylori IgM* συνολικά ένα θετικό ορό και πέντε ELISA B. Τα αντισώματα IgM συνοδεύονται συχνά από αντισώματα IgG.

## 9.2 Επαναληψιμότητα

Η ακρίβεια εντός της ίδιας σειράς δοκιμασιών διαπιστώθηκε με ορούς διαφορετικής αντίδρασης σε πολλαπλές δοκιμασίες 20 φορές σε έναν κύκλο δοκιμασίας. Η ακρίβεια μεταξύ δοκιμασιών διαπιστώθηκε με ορούς διαφορετικής αντίδρασης 10 φορές σε 10 ανεξάρτητες δοκιμασίες που διεξήχθησαν σε 5 διαφορετικές ημέρες.

$$\text{Συντελεστής μεταβολής (CV \%)} = \frac{\text{Πρότυπη απόκλιση}}{\text{Μέση τιμή}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgA:

Δείγμα	Μέση τιμή (OD)	Στην ίδια δοκιμασία (CV %)	Μέση τιμή (OD)	Μεταξύ δοκιμασιών (CV %)
αρνητικά	0.499	3.4	0.467	9.9
οριακά	0.627	4.6	0.580	10.0
ισχυρά θετικά	1.263	3.6	1.286	7.7

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgG:

Δείγμα	Μέση τιμή (OD)	Στην ίδια δοκιμασία (CV %)	Μέση τιμή (OD)	Μεταξύ δοκιμασιών (CV %)
οριακά	0.442	4.5	0.423	13.8
ισχυρά θετικά	1.513	2.4	1.514	11.0
ισχυρά θετικά	1.615	3.1	1.599	9.8

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgM


Δείγμα	Μέση τιμή (OD)	Στην ίδια δοκιμασία (CV %)	Μέση τιμή (OD)	Μεταξύ δοκιμασιών (CV %)
οριακά	0.342	5.8	0.346	13.0
οριακά	0.371	4.7	0.385	9.9
positive	0.658	5.5	0.661	9.2

## 10 ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

### 10.1 Προειδοποιήσεις/ Προφυλάξεις

Το SERION ELISA *classic* σχεδιάστηκε για τη χρήση από εκπαιδευμένο προσωπικό το οποίο είναι καλά εξοικειωμένο με τις εργαστηριακές πρακτικές.

Όλα τα αντιδραστήρια του kit και τα ανθρώπινα δείγματα θα πρέπει να χειρίζονται με προσοχή, χρησιμοποιώντας τις καθιερωμένες πρακτικές εργαστηριακές μεθόδους.

- Αυτό το kit περιέχει στοιχεία ανθρώπινου αίματος. Αν και όλοι οι οροί ελέγχου και οι οροί cut-off έχουν εξεταστεί και βρέθηκαν αρνητικοί για το αντίσωμα αντι-HIV, αντιγόνο HBs (αντιγόνο επιφάνειας ιός ηπατίτιδας B) και αντίσωμα αντι-HCV, θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικοί.
  - Μην πιπετάρετε με το στόμα.
  - Μην καπνίζετε, τρώτε ή πίνετε σε περιοχές στις οποίες χειρίζεστε δείγματα οι αντιδραστήρια του kit.
  - Φοράτε γάντια μίας χρήσης, προστατευτικά ρούχα και γυαλιά κατά τη διάρκεια χειρισμού των αντιδραστηρίων του kit ή των δειγμάτων. Πλύνετε σχολαστικά τα χέρια σας μετά από το χειρισμό.
  - Το υλικό των ασθενών και άλλο δυνητικά μολυσματικό υλικό θα πρέπει να απολυμαίνεται μετά από κάθε κύκλο δοκιμασίας.
  - Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να φυλάσσονται με ασφάλεια και να μη μπορούν να τα προσεγγίσουν αναρμόδια άτομα, π.χ. παιδιά.
  - Διάλυμα διακοπής  διαβρωτικός (C); προκαλεί όξινο έγκαυμα (R34)
- Χρησιμοποιείτε γυαλιά ασφαλείας, γάντια και προστατευτικά ρούχα κατά τη διάρκεια του χειρισμού!

### 10.2 Διάθεση

Παρακαλώ λάβετε υπόψη τις σχετικές νομικές απαιτήσεις!

## 11 ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Blaser, M. J. (1998) *Helicobacter pylori* and associated diseases. *BMJ* 316, 1507-10.
- [2] Heilmann, K. L., Borchard, F. (1991) Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrastructural findings. *GUT* 32, 137-40.
- [3] Kosunen, T. U. *et al.* (1992) Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339, 893-95.
- [4] Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori – Von der Grundlage zur Therapie* Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage, 11-23.
- [5] Malfertheiner, P. *et al.* (1997) Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Eur. J. Gastroent. Hep.* 9, 1-2.
- [6] Malfertheiner, P. *et al.* (1998) *Helicobacter pylori* Infektionen und Ulkuserkrankungen. *Chirurg* 69, 239-48.
- [7] Malfertheiner, P. (2004) *Helicobacter pylori* Infection – ein Update 2004. *Deutsch-Medicinische Wochenschrift* 129, 1821-6.
- [8] The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG, 1997): Current European concepts in the Management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut* 41, 8-13.
- [9] Warren, J. R., Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-5.
- [10] Xiang, Z., *et al.* (1995) Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63, 94.
- [11] Yamaoka, Y. *et al.* (1999) Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* 52, 215-8.



# **Atualizações**

**Favor observar as alterações em comparação com a versão anterior.**

**Versão atual n.º: V 13.11/12-1**

**Versão anterior n.º: V 12.10/01-1**

**Atualização na seção: Atualização geral, 5, 7.2.1**

## **SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM**

### **ÍNDICE**

- 1 UTILIZAÇÃO PREVISTA**
- 2 RELEVÂNCIA DIAGNÓSTICA**
- 3 PRINCÍPIO DO ENSAIO SERION ELISA *classic***
- 4 COMPONENTES DO KIT**
- 5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**
- 6 ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES**
- 7 Execução do teste SERION ELISA *classic***
  - 7.1 Instruções gerais
  - 7.2 Preparação e armazenamento das amostras
  - 7.3 Preparação dos reagentes do kit
  - 7.4 Execução do teste – apresentação resumida
  - 7.5 Realização do teste pelo método manual
  - 7.6 Realização do teste pelo método automatizado
  - 7.7 Controle positivo / Controlo da exatidão
- 8 VALIDAÇÃO DO TESTE**
  - 8.1 Quantificação de um ponto de acordo com o método-4PL
  - 8.2 Critérios de validação do teste
  - 8.3 Cálculos SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Limites de quantificação
  - 8.5 Intervalos “borderline”
  - 8.6 Interpretação dos resultados
  - 8.7 Intervalo de referência de indivíduos saudáveis
- 9 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**
  - 9.1 Sensibilidade e especificidade
  - 9.2 Reprodutibilidade
- 10 MEDIDAS DE SEGURANÇA**
  - 10.1 Advertências e medidas de precaução
  - 10.2 Eliminação de resíduos
- 11 LITERATURA**





# SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

## Ensaio imunoenzimático para a determinação de anticorpos humanos para uso em diagnóstico *in vitro*

SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgA	Artigo n.º:	ESR118A
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgG	Artigo n.º:	ESR118G
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgM	Artigo n.º:	ESR118M

### 1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

Os testes SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, IgG e IgM são imunoenaios quantitativos e qualitativos para a detecção de anticorpos humanos no soro ou no plasma contra *Helicobacter pylori*. A detecção separada de cada classe de imunoglobulinas permite a confirmação do contato com o agente patogênico e a determinação do estado patológico.

### 2 RELEVÂNCIA DIAGNÓSTICA

*Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa em forma de espiral cuja elevada motilidade se deve ao fato de possuir sete flagelos. A identificação microbiológica baseia-se em testes positivos de ureia, catalase e oxidase, assim como na ausência de hidrólise de hipurato e da redúctase de nitrato.

O *Helicobacter pylori* é um organismo muito específico do hospedeiro. Outras espécies de *Helicobacter* encontram-se em diversos mamíferos, como p. ex. gatos, cães, porcos e ratinhos.

As diferenças fenotípicas entre isolados de *H. pylori* referem-se exclusivamente à expressão ou não expressão de uma citotoxina vacuolizante (*Vacuolating Cytotoxin*, VacA) e de uma segunda toxina associada, codificada pelo CagA (*Cytotoxin-Associated Gene*, CagA). As estirpes virulentas (tipo I) e não virulentas (tipo II) de *Helicobacter* podem distinguir-se com base nestas diferenças fenotípicas.

Os doentes com úlceras duodenais estão mais frequentemente infectados com estirpes de *H. pylori* do tipo I, que expressam os genes VacA e CagA. Contudo, existem estudos que consideram improvável a existência de uma conexão causal entre a infecção por *Helicobacter* e o quadro clínico do carcinoma gástrico associado devido às estirpes de *Helicobacter* que produzem VacA e CagA.

O mecanismo de transmissão do *H. pylori* entre pessoas ainda não foi bem esclarecido. Na literatura, discutem-se como prováveis as vias de transmissão oral-oral e fecal-oral. As infecções por *H. pylori* dividem-se em dois grupos distintos, a saber, agudas e crónicas, sendo 80 a 90 % de todos os casos de gastrites atribuíveis a infecções por *H. pylori*.

As doenças associadas a *H. pylori* (isto é, doenças atribuíveis a uma gastrite induzida por uma infecção com *H. pylori*), são a úlcera duodenal (95 %), a úlcera gástrica (90 %) e o

linfoma MALT (*Mucosa Associated Lymphatic Tissue*) (60–70 %). Os indivíduos que sofrem de infecções crônicas por *Helicobacter pylori* apresentam um risco seis vezes superior de sofrer um linfoma MALT do que os indivíduos saudáveis.

Para o diagnóstico de infecções por *H. pylori*, distingue-se entre métodos não invasivos e invasivos. Dos procedimentos invasivos fazem parte a histologia e o teste rápido da urease (p. ex. teste CLO Test), técnicas microbiológicas como a cultura e testes de biologia molecular (PCR). O teste respiratório C<sup>13</sup> e a sorologia pertencem ao grupo dos métodos não invasivos.

As recomendações europeias para o tratamento de infecções por *Helicobacter pylori* foram constituídas pelo *European Helicobacter pylori Study Group* (EHPSG) no âmbito da «Conferência de Consenso de Maastricht» realizada em 1997. Foi então recomendada uma terapêutica de erradicação, a «terapêutica tripla», para todos os doentes com úlceras e resultados positivos para *H. pylori*. Além disso, todos os doentes dispépticos com menos de 45 anos e sem sintomas alarmantes devem ser examinados por métodos não invasivos, como a sorologia e, no caso de apresentarem resultados positivos, devem também ser tratados.

A detecção de anticorpos no soro pode ser usada para o controle da terapêutica após o tratamento de erradicação. Neste caso, deve decorrer um período de pelo menos seis meses até ao início destas medidas de controle do título de anticorpos para garantir que se podem detectar variações significativas do título. No caso das IgG, em particular, deve considerar-se a possibilidade de persistência durante vários meses ou mesmo anos, o que trará limitações à informação obtida a partir de métodos de controle puramente sorológicos. Recomenda-se o teste respiratório de C13 não invasivo para controle adicional.

As infecções associadas a *Helicobacter* têm de ser consideradas como tendo uma relação evidente com a idade dos doentes. A prevalência por década de vida aumenta em 10 % nas zonas industrializadas da América do Norte e da Europa Central. Nesta área, a prevalência total na população é de 40 %.

### 3 PRINCÍPIO DO ENSAIO SERION ELISA *classic*

O teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) é um imunoensaio, que é especialmente adequado para a determinação de anticorpos no campo das doenças infecciosas. A reação baseia-se na interação específica de anticorpos com os antígenos correspondentes. As cavidades da microplaca do kit SERION ELISA *classic* são revestidas com antígenos específicos do agente patogênico de interesse. Se existirem anticorpos na amostra de soro do paciente, eles são ligados ao antígeno fixo. Um anticorpo secundário, que foi conjugado com a enzima fosfatase alcalina, detecta e liga-se ao complexo imune. O substrato incolor p-nitrofenilfosfato é então convertido no produto corado p-nitrofenol. A intensidade do sinal do produto desta reação é proporcional à concentração do analito na amostra e é medido por fotometria.

#### 4 COMPONENTES DO KIT

Componentes do teste	Unidades / volume
<p><b>Tiras de microplacas quebráveis, cada uma com oito poços individuais revestidos com antígenos</b>                      (total de 96 poços) <b>[MTP]</b>,                      1 moldura de microplaca.                      O material de revestimento está inativado.</p>	12 unidades
<p><b>Soro padrão (pronto para uso) <b>[STD]</b>,</b>                      Soro humano diluído em solução proteica tamponada;                      negativo para Ac anti-HIV, Ag HBs (antígeno de superfície do vírus da hepatite B) e Ac anti-HCV;                      conservante: azida de sódio a &lt; 0,1 %;                      corante: amaranto O.</p>	2 x 2 ml
<p><b>Soro de controle negativo (pronto para uso) <b>[NEG]</b>,</b>                      Soro humano diluído em solução proteica tamponada;                      negativo para Ac anti-HIV, Ag HBs (antígeno de superfície do vírus da hepatite B) e Ac anti-HCV;                      conservante: azida de sódio a &lt; 0,1 %;                      corante: verde lissamina V.</p>	2 ml
<p><b>Conjugado anti-IgA, IgG ou IgM humano (pronto para uso) <b>[APC]</b>,</b>                      Anticorpo policlonal dirigido contra IgA, IgG ou IgM humanos,                      conjugado com fosfatase alcalina, estabilizado em solução proteica;                      conservante: metilisotiazolona a 0,01 %, bromonitrodioxano a 0,01 %.</p>	13 ml
<p><b>Concentrado de solução de lavagem (suficiente para 1000 ml) <b>[WASH]</b>,</b>                      Solução de cloreto de sódio com Tween 20 e 30 mM Tris/HCl, pH 7,4;                      conservante: azida de sódio a &lt; 0,1 %.</p>	33,3 ml
<p><b>Tampão de diluição <b>[DILB]</b>,</b>                      Tampão de fosfato contendo proteína e Tween 20;                      conservante: azida de sódio a &lt; 0,1 %;                      corante: azul de bromofenol 0,01 g/l.</p>	2 x 50 ml
<p><b>Solução de parada <b>[STOP]</b>,</b>                      1,2 N hidróxido de sódio.</p>	15 ml
<p><b>Substrato (pronto para uso) <b>[pNPP]</b>,</b>                      Para-nitrofenilfosfato em tampão isento de solventes;                      conservante: azida de sódio a &lt; 0,1 %                      (No frasco ainda fechado o substrato pode apresentar uma coloração ligeiramente amarelada. Isto não compromete a qualidade do produto!)</p>	13 ml
<p><b>Certificado de controle de qualidade com curva padrão e tabela de valores <b>[INFO]</b></b>                      (quantificação dos anticorpos em UI/ml ou U/ml).</p>	2 páginas

## 5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- equipamentos comuns de laboratório
- para a detecção de IgM: absorvente Fr SERION, código n.º Z200 (20 ml)
- Leitor de ELISA fotométrico para microplacas com filtro, comprimento de onda 405 nm, comprimento de onda de referência recomendado na gama de 620 nm a 690 nm (p. ex. 650 nm)
- incubadora 37 °C
- câmara húmida
- água destilada
- cliques de pressão (código n.º VT120)

## 6 ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

Reagente	Armazenamento	Validade
Tiras de microtitulação (revestidas com antígeno)	Fechadas  Após a abertura, entre 2 e 8 °C no saco de alumínio fechada, junto com o dessecante  <i>As tiras não utilizadas devem ser armazenadas secas no saco de alumínio hermeticamente fechado.</i>	ver o prazo de validade;  prazo de validade ou 4 semanas;  no caso de utilização e conservação corretas: até expirar o prazo de validade
Soros de controle / soros padrão	Após a abertura: entre 2 e 8 °C	ver o prazo de validade;  24 meses a partir da data de fabricação
Conjugados	Solução pronta para uso: entre 2 e 8 °C <i>Evitar contaminação – p. ex., utilizando somente pontas de pipetas esterilizadas</i>	ver o prazo de validade;  28 meses a partir da data de fabricação
Tampão de diluição	Fechado  Após a abertura: entre 2 e 8 °C  <i>Rejeitar as soluções turvas.</i>	ver o prazo de validade;  36 meses a partir da data de fabricação  24 meses
Solução de lavagem	Concentrado após a abertura: entre 2 e 8 °C Diluição de utilização entre 2 e 8 °C Diluição de utilização à temperatura ambiente <i>Limpar regularmente os recipientes utilizados para a diluição de utilização. Rejeitar as soluções turvas.</i>	ver o prazo de validade;  2 semanas;  1 semana
Substrato	Solução pronta para uso: entre 2 e 8 °C, armazenada protegida da luz <i>Evitar contaminação – p. ex., utilizando somente pontas de pipetas esterilizadas</i> <i>Rejeitar no caso de coloração amarela mais intensa (extinção contra água destilada &gt; 0,25 DO).</i>	ver o prazo de validade;  36 meses a partir da data de fabricação
Solução de parada	Após a abertura, à temperatura ambiente	ver o prazo de validade

## 7 Execução do teste SERION ELISA *classic*

### 7.1 Instruções gerais

Utilizar exclusivamente os reagentes SERION ELISA *classic*, uma vez que estão otimizados para o sistema, e não os substituir por reagentes de outros fabricantes. Os soros padrão e os soros de controle dos imunoenaios SERION ELISA *classic* estão ajustados para o lote específico dos testes dos kits e não podem ser utilizados em outros lotes. O tampão de diluição, a solução de lavagem, o substrato e a solução de parada poderão ser utilizados em todos os testes SERION ELISA *classic*, independentemente do lote e do kit.

Para cada classe de imunoglobulina existem três concentrações diferentes de conjugado: BAIXA, MÉDIA, ALTA. A classificação consta em cada etiqueta, conforme descrito a seguir:

p. ex.: IgG +	conjugado IgG de baixa concentração
IgG ++	conjugado IgG de média concentração
IgG +++	conjugado IgG de alta concentração

Em raros casos faz-se necessário o emprego de conjugados especiais, a fim de assegurar a qualidade dos nossos produtos. Os conjugados especiais são produzidos em lotes separados e não apresentam o sinal "+". Sendo assim, não podem ser substituídos por outros conjugados.

Observar com atenção os avisos registados nas etiquetas!

Em estado fechado, todos os componentes dos testes SERION ELISA *classic* poderão ser utilizados até o seu limite de validade (vide as indicações da etiqueta), desde que sejam armazenados corretamente. Os reagentes não devem ser utilizados após a data de validade.

Qualquer alteração ou a diluição incorreta dos reagentes poderá causar uma perda da sensibilidade.

Os reagentes do teste deverão ser protegidos contra a luz forte durante o armazenamento e a incubação. Após a utilização devem ser bem fechados, a fim de evitar que sequem ou sejam contaminados.

O saco de alumínio para a microplaca somente deve ser cortado nos lugares previstos do lado marcado, para que possa ser fechado novamente. Em caso de danificação do saco de alumínio ou de fechamento incompleto do mesmo, as tiras não utilizadas não devem mais ser empregadas para testes.

Para evitar a contaminação, empregar sempre técnicas assépticas para extrair as alíquotas de reagentes. Para evitar falsos resultados positivos, a ponta da pipeta nunca deverá tocar, nem molhar, a borda superior dos poços durante a pipetagem do conjugado. Tome cuidado para não trocar as tampas dos frascos.

A reprodutibilidade dos resultados depende, dentre outros fatores, da mistura cuidadosa dos reagentes preparados. Antes de utilizar os soros de controle e o conjugado, os recipientes deverão ser bem agitados. As amostras também devem ser bem misturadas após a diluição (p. ex. com um vórtex).

A pipetagem deve ser efetuada cuidadosamente, observando-se os tempos e temperaturas de incubação prescritos. Grandes diferenças de tempo entre a pipetagem do primeiro e do último poço na adição de amostras/soros de controle, conjugado e substrato levam a “tempos de pré-incubação” diferentes, o que poderá influenciar consideravelmente a precisão e a reprodutibilidade dos valores medidos.

Só o cumprimento rigoroso destas instruções garante resultados corretos.

O teste SERION ELISA *classic* só será válido se forem observados os critérios de validação específicos para o lote. Estes critérios estão indicados no certificado de controle de qualidade contido no kit.

Uma lavagem correta evita testes inespecíficos. Por isso, as instruções de utilização dos aparelhos de lavagem deverão ser observadas. Os poços de fundo plano devem ser enchidos uniformemente com solução de lavagem. Ao fim do procedimento, é importante certificar-se de que a solução de lavagem foi completamente removida dos poços, a fim de evitar efeitos de diluição incontroláveis. Evite a formação de espuma!

Durante a lavagem e a aspiração, tome cuidado para não danificar a inscrição (patógeno / classe de anticorpo) das tiras de microtitulação a fim de evitar equívocos.

## 7.2 Preparação e armazenamento das amostras

Amostras lipêmicas, hemolíticas ou ictericas (soro ou plasma) só deverão ser utilizadas sob cuidado específico. Obviamente, amostras contaminadas não devem ser testadas. As amostras de soro ou plasma (EDTA, citrato, heparina) coletadas de acordo com métodos laboratoriais padronizados são consideradas ideais. As amostras não devem ser inativadas termicamente.

### 7.2.1 Diluição das amostras

Antes do início do teste, diluir as amostras dos pacientes ( $V_1$ ) em tampão de diluição ( $V_2$ ) do seguinte modo:

#### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG

$V_1 + V_2 = 1+100$	em	10 $\mu$ l	de amostra do paciente
	por	1000 $\mu$ l	de tampão de diluição

Após cada diluição, e antes da pipetagem na microplaca, as amostras devem ser bem misturadas a fim de se obter uma solução homogênea.

## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM

### Interferência de fatores reumatóides

Os fatores reumatóides são predominantemente anticorpos da classe IgM, que se ligam de preferência aos imunocomplexos IgG. A presença de anticorpos IgM inespecíficos (fatores reumatóides) pode produzir falsos resultados positivos na prova específica de IgM. Além disso, existe a possibilidade de os anticorpos IgM, de ligação mais fraca, específicos do micróbio patogênico serem suplantados pelos anticorpos IgG, de ligação mais forte. Um despiste IgM pode assim originar um falso resultado negativo. Por esta razão, é necessário submeter as amostras para a determinação de IgM a um tratamento preliminar com absorvente de fator reumatóide (Absorvente SERION de Fator Reumatóide, artigo nº Z200 (20 ml/100 testes)). Para executar a absorção de Fr, a amostra do doente em tampão de diluição Fr é incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C. O procedimento encontra-se descrito num manual de instruções específico.

Antes do ensaio, é necessário efetuar primeiro uma diluição 1+4 do absorvente de fator reumatóide ( $V_1$ ) com tampão de diluição ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	em	200 $\mu$ l	de absorvente-Fr
	por	800 $\mu$ l	de tampão de diluição

As amostras dos pacientes ( $V_4$ ) terão de ser diluídas neste tampão de diluição Fr ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1+100$	em	10 $\mu$ l	de amostra do paciente
	por	1000 $\mu$ l	de tampão de diluição Fr

Após cada diluição, e antes da pipetagem na microplaca, as amostras devem ser bem misturadas a fim de se obter uma solução homogênea.

### 7.2.2 Armazenamento das amostras

As amostras dos pacientes não deverão ser armazenadas entre 2 e 8 °C por um período maior que 7 dias. É possível armazenar as amostras durante mais tempo se as mesmas forem armazenadas a um temperatura menor ou igual a -20 °C. Evitar congelamento e descongelamento repetidas vezes. As amostras diluídas poderão ser guardadas entre 2 e 8 °C durante uma semana.



### 7.3 Preparação dos reagentes do kit

Deixar todos os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes de os utilizar.

#### 7.3.1 Tiras da microplaca

As 12 tiras da microplaca estão embaladas em uma moldura juntamente com um agente dessecante num saco de alumínio. Retirar da moldura os poços que não serão utilizados e colocá-los novamente no saco de alumínio com o dessecante, fechando-a hermeticamente.

#### 7.3.2 Soros de controle / soros padrão

Os controles e padrões são prontos para uso e não deverão ser diluídos. Independentemente do número de tiras de microplaca utilizado, em cada teste deverão ser incluídos soros de controle em determinações simples e soros padrão em determinações duplas (duplicata).

Não tratar os soros de controle com absorvente de Fr.

#### 7.3.3 Conjugado AP anti-IgA, IgG ou IgM humanos (pronto para uso)

Os conjugados com a mesma concentração e a mesma classe de imunoglobulina são permutáveis. Evitar a contaminação de conjugados prontos para uso – p. ex., utilizando pontas de pipetas esterilizadas.

#### 7.3.4 Solução de lavagem

Diluir o concentrado de solução de lavagem ( $V_1$ ) 1:30 com água destilada a um volume final ( $V_2$ ).

Exemplo:

Concentrado de solução de lavagem ( $V_1$ )	Volume final ( $V_2$ )
33,3 ml	1000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Tampão de diluição para amostras (pronto para uso)

#### 7.3.6 Substrato (pronto para uso)

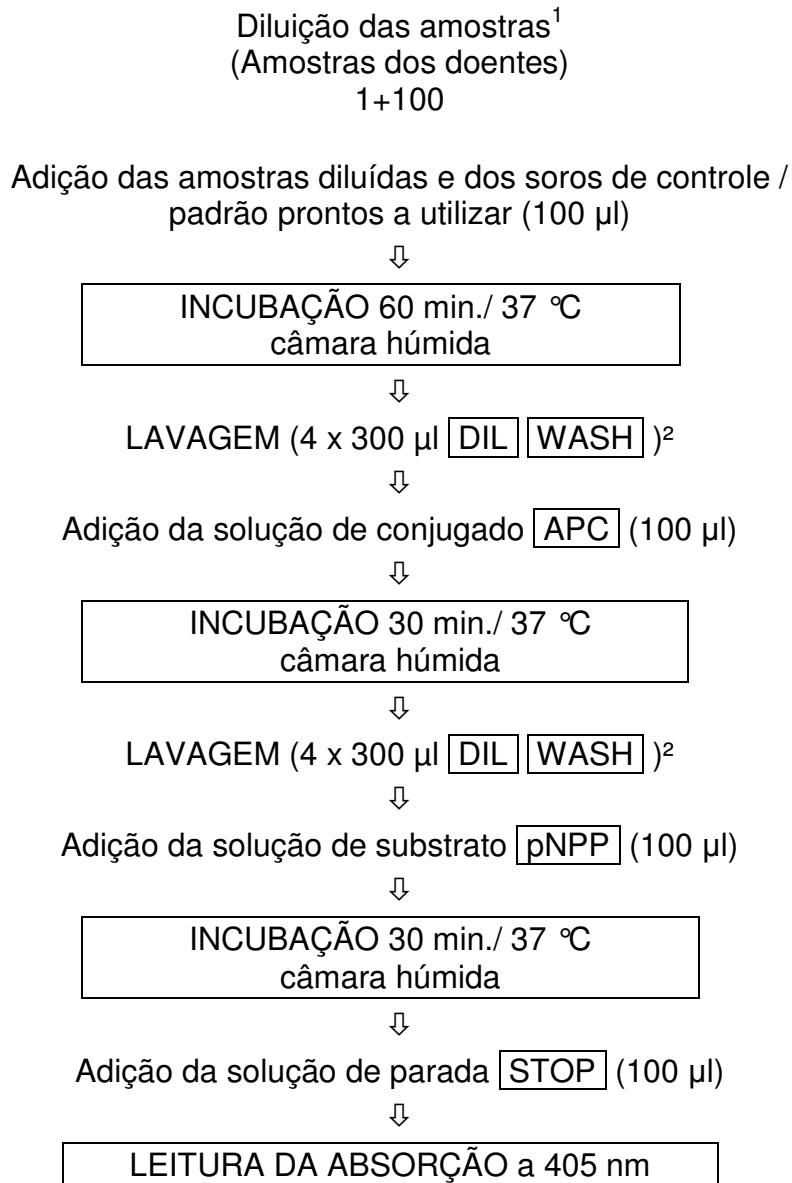
Evitar a contaminação da solução pronta para uso do substrato – p. ex., utilizando pontas de pipetas esterilizadas.

#### 7.3.7 Solução de parada (pronto para uso)

## 7.4 Execução do teste – apresentação resumida

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM quantitativo

No caso de detecção de IgM com absorção de fator reumatóide, ver N.º 7.2.1;  
Incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C



<sup>1</sup>Tampões de diluição especiais para os seguintes testes SERION ELISA *classic*:  
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, EBV EA IgG, Parvovírus B19 IgM e Hantavírus Puumala IgG, IgM

<sup>2</sup> Para lavagem manual: no fim do procedimento, bata suavemente a placa em toalhas de papel.

## 7.5 Realização do teste pelo método manual

1. Colocar o número necessário de **poços na moldura da microplaca** e preparar a folha de protocolo.
2. Adicionar **100 µl de cada uma das amostras diluídas, ou dos controles prontos para uso**, nos respectivos poços das tiras da microplaca. Deixe um poço livre para o Branco do substrato, p. ex.:

IgA/IgG/IgM quantitativo	
poço n.º	
poço A1	branco do substrato
poço B2	controle negativo
poço C1	soro padrão
poço D1	soro padrão
poço E1	paciente - 1....

3. **Incubação das amostras** durante 60 minutos (+/- 5 min.) a 37°C (+/- 1°C) em câmara húmida.
4. No fim do tempo de incubação, **lavar** todos os poços (com equipamento automatizado ou manual):
  - Aspirar ou esvaziar o líquido de incubação dos poços
  - Encher cada poço com 300 µl de solução de lavagem
  - Aspirar ou esvaziar a solução de lavagem
  - Repetir o processo mais 3 vezes (isto é, lavar 4 vezes no total)
  - Esvaziar a placa, batendo-a sobre toalhas de papel
5. **Adição do conjugado**  
Adicionar 100 µl do conjugado IgA/IgG/IgM pronto para uso nos respectivos poços (exceto branco do substrato)
6. **Incubação do conjugado** durante 30 minutos (+/- 1 min.)\* a 37°C (+/- 1 °C) em câmara húmida.
7. No fim do tempo de incubação, **lavar** todos os poços (como descrito acima)
8. **Adição do substrato**  
Adicionar 100 µl do substrato pronto para uso em cada um dos poços (também no do branco do substrato)
9. **Incubação do conjugado** durante 30 minutos (+/- 1 min.)\* a 37°C (+/- 1 °C) em câmara húmida.
10. **Parada da reação**  
Adicionar 100 µl da solução de parada em cada um dos poços e agitar levemente a microplaca para misturar a solução.
11. **Leitura da absorção**  
Dentro de 60 minutos, determinar a densidade ótica (DO) a 405 nm contra o branco do substrato; comprimento de onda de referência entre 620 nm e 690 nm (p. ex. 650 nm).

\* Leve em consideração que, sob condições de trabalho especiais, poderá ser necessário ajustar os tempos de incubação internos do laboratório.

## 7.6 Realização do teste pelo método automatizado

Os testes SERION ELISA são adequados para o processamento automatizado, tendo sido validados com os equipamentos Immunomat™, DYNEX DSX® e DYNEX DS2®. O processamento automatizado é realizado de maneira análoga ao método manual. Leve em consideração que, sob condições de trabalho especiais, poderá ser necessário ajustar os tempos de incubação internos do laboratório.

## 7.7 Controle positivo / Controlo da exatidão

Para verificação periódica do método do teste, em conformidade com os requisitos dos sistemas internos de gestão de qualidade do laboratório, recomendamos a utilização dos Controles SERION ELISA *controls* para determinar a precisão e a confiabilidade dos testes realizados com os kits SERION ELISA *classic*. A utilização dos Controles SERION ELISA *controls* encontra-se descrita em manual de instruções específico.

## 8 VALIDAÇÃO DO TESTE

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Quantificação de um ponto de acordo com o método-4PL

Uma atribuição otimizada dos sinais de absorção para valores quantitativos é garantida pelo uso de funções não-lineares, que ajustam uma curva sigmoide sem qualquer transformação posterior para valores de DO. A determinação da concentração de anticorpos com o kit SERION ELISA *classic* realiza-se de acordo com o modelo “4-parameter logistic-log” (4PL), cuja função matemática é descrita pela fórmula seguinte:

$$DO = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \text{em conc.})}}$$

Os parâmetros A, B, C e D representam exatamente o perfil da curva e definem:

- |                               |               |
|-------------------------------|---------------|
| 1. assíntota inferior         | ⇒ parâmetro A |
| 2. subida da curva            | ⇒ parâmetro B |
| 3. ponto de inflexão da curva | ⇒ parâmetro C |
| 4. assíntota superior         | ⇒ parâmetro D |

O Instituto Virion\Serion GmbH (Würzburg, Alemanha) averigua as curvas padrão para cada lote do kit em testes repetidos, realizados sob ótimas condições. Desta forma, os laboratórios poupam os elevados custos e tempo dispendidos na construção da curva padrão.

Para avaliar as concentrações de anticorpos, em cada embalagem do kit SERION ELISA *classic* é fornecida uma curva padrão e uma tabela de valores específicos para o lote. O software de avaliação SERION *evaluate* e a ferramenta para Microsoft® Excel SERION *avidity* estão disponíveis sob solicitação.

Para compensar variações normais de testes, e para poder verificar a qualidade dos testes realizados, utiliza-se o soro padrão a cada teste. No controle de qualidade do fabricante, são atribuídos a este soro de controle um *valor de referência* e um *intervalo de validade*. Dentro deste intervalo, a quantificação da concentração de anticorpos é segura e confiável.

## 8.2 Critérios de validação do teste

- O branco de substrato deverá ter um valor DO < 0.25.
- O controle negativo deverá produzir um resultado de teste negativo.
- Nos testes quantitativos SERION ELISA *classic*, o valor DO médio do soro padrão (após a dedução do branco de substrato) deverá encontrar-se dentro do intervalo de validade indicado no certificado de controle de qualidade específico para o lote.
- A variação dos valores DO do soro padrão não deverá ser maior que 20 %.

Se estes critérios não forem satisfeitos, o teste será inválido e deverá ser repetido.

## 8.3 Cálculos SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Avaliação não automatizada

Para a avaliação dos testes SERION ELISA *classic*, é fornecido em cada kit um certificado de controle de qualidade, específico para o lote, que contém a curva padrão e uma tabela de valores. Com base nestas, os valores DO obtidos poderão ser atribuídos às atividades de anticorpos correspondentes. O branco de substrato deverá ser descontado de todos os valores DO antes das avaliações.

#### Método 1: Avaliação qualitativa

Para a determinação do intervalo *cut-off*, multiplica-se o valor médio da DO do soro padrão pelos valores numéricos indicados no certificado de controle de qualidade (vide as fórmulas para os sistemas especiais), p. ex.:

DO = 0,502 x valor médio (PADRÃO) no limite superior de *cut-off*

DO = 0,352 x valor médio (PADRÃO) no limite inferior de *cut-off*

Se, por exemplo, o valor médio de absorção do soro padrão for de 0,64, o intervalo *cut-off* será de 0,225 a 0,321.

## Método 2:

Determinação contínua das atividades de anticorpos, por meio da curva padrão

As *variações interensaios* (variações nos testes que ocorrem no dia-a-dia ou de laboratório para laboratório) são compensadas através da multiplicação do valor de medição atual das amostras dos pacientes pelo fator de correção F. Este fator é calculado do seguinte modo:

$$F = \frac{\text{valor DO de referência (do soro padrão)}}{\text{valor DO atual (do soro padrão)}}$$

Este procedimento é necessário para ajustar o nível atual do teste do técnico do laboratório à curva padrão específica do lote. Primeiro as variações diárias deverão ser corrigidas por meio do cálculo do fator F.

1. Calcular o valor médio dos dois valores DO do padrão e verificar se o valor se encontra na gama de validade indicada.
2. Cálculo do fator F: o valor de referência indicado deverá ser dividido pelo valor médio da absorção do soro padrão:  
 $F = \text{valor de referência absorção soro padrão} / \text{valor médio absorção soro padrão}.$
3. Todos os valores de absorção das amostras dos pacientes são multiplicados por F.
4. Com base na curva padrão e nos valores de medição corrigidos, podem ser determinadas as atividades de anticorpos em UI/ml ou U/ml.

### 8.3.2 Validação automática do teste com o software SERION *evaluate*

Depois de introduzidos os quatro parâmetros e o valor de referência do soro padrão, as atividades dos anticorpos são calculadas pelo programa de avaliação SERION *evaluate* após o processamento e a medição dos testes SERION ELISA *classic*.

Se a densidade ótica (DO) do padrão estiver fora do intervalo de validade, a seguinte mensagem será mostrada (em inglês):

„Standard values out of ranges in following groups: Group 1-24.” ou  
„Standard value differ more than 20 % in following groups: Group 1-24.”

Nestes casos, o teste é inválido, devendo ser repetido.

Os parâmetros e o valor de referência só deverão ser mudados em caso de troca do lote (os parâmetros e o valor de referência estão indicados na tabela de valores). É possível verificar se os dados específicos do lote foram introduzidos corretamente com base na atividade (em UI/ml ou U/ml) atribuída ao soro padrão. O valor médio das unidades resultante deverá corresponder ao valor de unidade indicado no certificado específico do lote. Uma correção dos valores de absorção é efetuada automaticamente. Na impressão dos valores de absorção (versão padrão) aparecerá:

Código da amostra: Valor DO UI/ml ou U/ml Avaliação
--

### 8.4 Limites de quantificação

Os limites de quantificação estão especificados no certificado de controle de qualidade do teste SERION ELISA *classic*. A linearidade da diluição dentro deste intervalo foi demonstrada em estudos de avaliação abrangentes. No caso de a amostra do paciente apresentar um resultado acima do limite de quantificação, a amostra poderá ser analisada com uma diluição maior. A atividade de anticorpo determinada deste modo deverá ser multiplicada pelo fator de diluição adicional.

### 8.5 Intervalos “borderline”

Os intervalos “borderline” dos testes SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM estão especificados nos certificados de controle de qualidade e indicam as gamas dos resultados de teste limites. Valores de teste, obtidos de amostras de pacientes, que se situem abaixo deste intervalo indicam resultados negativos; valores que se situem acima deste intervalo são interpretados como positivos. Nos casos em que os resultados se encontrem dentro do intervalo “borderline”, não é possível uma interpretação definitiva. Nestes casos, o teste deve ser repetido paralelamente a uma outra amostra, colhida do paciente uma ou duas semanas depois (par sérico).



## 8.6 Interpretação dos resultados

O aparecimento de resultados positivos nos testes SERION ELISA classic *Helicobacter pylori* IgG, IgA e IgM indica a presença de anticorpos específicos contra *Helicobacter pylori*. Um resultado serológico positivo deverá sempre ser interpretado com a anamnese do doente e o seu quadro clínico, uma vez que um resultado positivo nem sempre distingue entre uma doença ativa no presente e a presença de anticorpos devido às taxas de seroprevalência na população em geral. Contudo, um resultado negativo indica que o doente apresenta um estado seronegativo. Contudo, no caso de suspeita clínica de infecção, tais resultados negativos não excluem a possibilidade de infecção, pois a amostra pode ser tida colhida demasiado precocemente para a detecção de anticorpos. Nestes casos, há que recolher outra amostra aproximadamente duas semanas mais tarde.

A sorologia de *Helicobacter* não deverá centrar-se exclusivamente na detecção de anticorpos IgG, pois pode encontrar-se a combinação IgG negativo/IgA positivo em 2 a 7 % dos doentes com infecções agudas por *Helicobacter pylori*. Por outro lado, 15 a 35 % dos doentes com infecção aguda por *Helicobacter pylori* não produzem IgA específico do agente patogénico, de maneira que o diagnóstico só é possível por meio da detecção de outras classes de imunoglobulinas. Por conseguinte, deve realizar-se em simultâneo a sorologia de IgG e IgA anti-*Helicobacter*. As seguintes combinações de anticorpos podem ser interpretadas da seguinte forma:

**Tabela 1: Interpretação das várias combinações de anticorpos na sorologia de *Helicobacter***

IgM	IgA	IgG	Interpretação
-	-	-	Estado seronegativo; caso existam sintomas clínicos, há que recolher soro de controle cerca de 2 semanas mais tarde
+/-	-	+	Estado seropositivo após contato com o antígeno ou infecção ativa com ausência de resposta de IgG,
-	-	+	Seroprevalência dependente da idade do doente («epidemicidade»)
+/-	+	+	Suspeita de infecção ativa com <i>H. pylori</i> ; padrão de reação típico em doentes com gastrite (ativa)
+/-	+	-	Suspeita de infecção ativa por <i>H. pylori</i> com ausência de resposta de IgG (2–7 % dos casos)

## 8.7 Intervalo de referência de indivíduos saudáveis

A análise de soros de doadores de sangue aleatórios, colhidos na região do sul da Alemanha, com os testes SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA, IgG e IgM resultou na distribuição que se segue. Dos 47 soros analisados com o teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA, 39 (83,0 %) foram negativos, 5 soros (10,6 %) reagiram de forma positiva e 3 soros (6,4 %) apresentaram valores-limite. Dos 47 soros, 41 (87,2 %) foram negativos quando analisados com o teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG, 4 soros (8,5 %) originaram resultados positivos e 2 soros (4,3 %) apresentaram valores-limite. Além disso, os resultados da análise dos 47 soros com o teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgM foram: 35 soros (74,5 %) foram negativos, 6 (12,8 %) reagiram de forma positiva e 6 soros (12,8 %) apresentaram valores-limite.

## 9 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### 9.1 Sensibilidade e especificidade

#### SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG:

Para estabelecer as características do desempenho do SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG, analisou-se um total de 88 soros. Destes, 41 provinham de doadores de sangue aleatórios e 47 soros provinham de doentes com suspeita de infecção por *Helicobacter* corroborada por resultados de análises anteriores. Os soros foram analisados com o SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG e dois outros testes ELISA disponíveis no mercado, dando os seguintes resultados de desempenho:

SERION ELISA <i>classic</i> <i>Helicobacter pylori</i> IgG	Sensibilidade	Especificidade
Dados de desempenho <i>versus</i> ELISA 1	96,6 %	94,3 %
Dados de desempenho <i>versus</i> ELISA 2	91,1 %	> 99 %

Além disso, foi realizado um estudo externo em França pela AFSSAPS (*Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé*). Este consistiu no exame de um total de 92 soros. 44 de 45 amostras de doentes com infecção comprovada por *Helicobacter* foram corretamente identificados pelo teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori*, tendo um soro apresentado valores-limite. 42 de 47 amostras de soro de indivíduos comprovadamente não infectados foram registadas como negativas, 2 como apresentando valores-limite e 3 manifestaram resultados positivos falsos. Estes resultados corroboram os resultados do estudo interno. Os resultados deste estudo externo podem ser encontrados em <http://www.afssaps.fr>.

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA:

Para avaliar o teste SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, foi analisado um total de 146 amostras de soro. O grupo de soro 1 consistiu em 54 soros de doadores de sangue aleatórios, enquanto o grupo de soro 2 continha 87 soros de doentes a quem foi realizada gastroscopia e cujo material recolhido para biópsia dava resultados positivos no teste da uréase (teste CLO), tendo sido caracterizados como positivos para *H. pylori* com base nas análises histológicas. Além disso, foram examinados 5 soros de doentes com anticorpos contra *Campylobacter jejuni* para analisar eventuais reações cruzadas.

As amostras foram analisadas com o teste SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, comparando-o com quatro outros testes ELISA disponíveis no mercado (testes A e D). Os resultados discrepantes (ou seja, soros que não produziam o mesmo resultado em pelo menos 4 dos 5 testes ELISA) foram avaliados por um teste «imunoblot» disponível no mercado.

#### Resultados: Grupo de soro 1:

Teste	Correlação	Prevalência	Sensibilidade	Especificidade
SERION ELISA <i>classic</i>	96,0 %	20,0 %	80,0 %	100 %
ELISA A	93,0 %	16,3 %	100 %	91,7 %
ELISA B	93,9 %	20,4 %	80,0 %	97,4 %
ELISA C	84,3 %	19,6 %	20,0 %	100 %
ELISA D	95,7 %	19,1 %	88,9 %	97,4 %

No total, 10 soros foram determinados como positivos. Oito soros apresentaram resultados positivos no teste SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori e nas ELISAs B e D. O teste A foi o mais sensível, mas três soros apresentaram valores-limite e não foram utilizados no cálculo estatístico. Não se verificaram diferenças significativas nos cálculos da prevalência.

#### Resultados: Grupo de soro 2:

Teste	Correlação	Prevalência	Sensibilidade	Especificidade
SERION ELISA <i>classic</i>	91,3 %	59,4 %	85,4 %	100 %
ELISA A	82,2 %	67,1 %	100 %	45,8 %
ELISA B	88,9 %	61,1 %	81,8 %	100 %
ELISA C	86,3 %	65,0 %	78,8 %	100 %
ELISA D	89,5 %	63,2 %	83,3 %	100 %

No teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA e nos testes ELISA B-D, 28 soros de 87 soros colhidos sequencialmente foram avaliados e confirmados como negativos. No ELISA A, 13 destes soros originaram resultados positivos. A prevalência indica a proporção de resultados positivos em cada grupo de soro. A sensibilidade calculada é inferior quando comparada à ELISA de IgG. Isto deve-se em parte ao fato de a resposta imunitária de IgG ser dirigida sobretudo contra as proteínas CagA e urease B do *H. pylori*, enquanto a resposta de IgG se dirige contra todas as proteínas do complemento do organismo.

As diferenças observadas nas respostas dos anticorpos IgG e IgA, acrescidas ao fato de a proteína urease B ser a principal responsável pela ligação não específica aos anticorpos, são um motivo provável para a baixa correlação das determinações de IgG e, em particular, pelo fato de a comparação entre os testes de ELISA e «imunoblot» ser apenas possível em parte. Este estudo salienta a importância da detecção dos anticorpos IgA no diagnóstico das infecções por *H. pylori* e demonstra uma prevalência 2 a 5 vezes superior de anticorpos IgA nos doentes com infecção confirmada (grupo de soro 2) face à população normal (grupo de soro 1). Não foram observadas reações cruzadas do teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA com *Campylobacter jejuni* (cinco soros testados). Isto verificou-se também nas ELISAs B a D, enquanto na ELISA A um soro apresentou resultado positivo.

Quando se incluem todos os 146 soros no cálculo das características de desempenho do SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA, observa-se uma sensibilidade de 84,3 % e uma especificidade de 100 %, com um melhor resultado de correlação de 93,5 %. Só o ELISA A apresentou uma sensibilidade de 100 %, embora a expensas de uma baixa especificidade de 73,8 %. Os testes ELISA B e D são comparáveis ao teste SERION ELISA *classic*, com sensibilidades de 81,5 % e 84,2 % e especificidades de 98,6 % e 100 %, respectivamente. ELISA C apresentou a pior sensibilidade, com um valor de 69,4 % (especificidade de 100 %).

### **SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgM**

Para avaliar o teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgM, foi analisado um total de 186 amostras de soro de adultos. O grupo de soro 1 consistiu em soros de 45 dadores de sangue aleatórios, enquanto o grupo de soro 2 continha 119 soros com infecção comprovada. Um terceiro painel de soros, o grupo de soro 3, consistiu em seis soros de doentes com anticorpos contra *Campylobacter jejuni*, sete seropositivos para *Chlamydia spec*, três com anticorpos contra *Borrelia burgdorferi*, três com anticorpos contra *Legionella pneumophila*, um com anticorpos contra *Brucella spp.* e dez com elevada atividade do fator reumatóide.

As amostras foram analisadas com o teste SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgM, comparando-o com dois outros testes ELISA disponíveis no mercado. Dado só estarem disponíveis no mercado dois testes de ELISA comparáveis de qualidade adequada e não existir nenhum ensaio «imunoblot», os resultados positivos foram adicionalmente analisados com os testes ELISA para IgG e IgA. Para determinar a sensibilidade e a especificidade, foi efetuada uma comparação directa entre o teste disponível no mercado e o SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgM.

3,2 % das amostras de soro (6/186) apresentaram resultados positivos pelo menos no SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM e num outro teste ELISA, paralelamente, seis dos soros testados deram valores-limite em pelo menos um ELISA adicional. A literatura publicada a nível internacional indica uma taxa de resultados positivos para IgM na população em geral de 1 % a 11 %, o que é confirmado pelos resultados obtidos neste estudo. No total, 98 (140) soros apresentaram resultados negativos em todos os ELISAs (pelo menos em dois ELISAs). Isto equivale a 52,7 % (75,3 %). Nenhuma amostra deu resultados positivos em todos os três testes ELISA, embora sete tenham apresentado valores-limite em pelo menos dois ELISAs (3,8 %). No total, pelo menos 59 soros (31,7 %) atingiram valores-limite em pelo menos um teste. Tendo em consideração todos os 186 soros, o SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM, em comparação com dois outros ELISAs, obteve uma sensibilidade de 100 % e, comparado com ELISA A, uma especificidade de 80,1 % (correlação 80,3 %) e, com ELISA B, uma especificidade de 75,5 % (correlação 76 %). As sensibilidades reduzidas resultam do fato de nenhum dos testes de comparação ter reconhecido qualquer soro como positivo, tornando impossível uma comparação das sensibilidades entre estes dois testes. Se incluirmos apenas os 45 soros de doadores de sangue nos cálculos, as sensibilidades e a correlação aumentam em cerca de 10 %. É de notar que os soros dos 45 doadores de sangue foram previamente avaliados e considerados positivos em estudos anteriores. Em 17 de 119 doentes, foram registados resultados positivos em testes independentes. O ELISA A registou, com o teste SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM, um total de um soro positivo; este valor foi de cinco com o ELISA B. Os anticorpos IgM são frequentemente acompanhados de anticorpos IgG.

## 9.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade intra-ensaio foi averiguada com soros de reatividade diferente em preparação múltipla (n = 20) dentro de uma preparação do ensaio. Para a determinação da reprodutibilidade interensaio, foram testados 10 vezes soros com reatividades diferentes em 10 preparações realizadas independentemente em 5 dias distintos.

$$\text{Coeficiente de variação (CV \%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Valor médio}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgA:

Amostra	Valor médio (OD)	Intra-ensaio (CV %)	Valor médio (OD)	Interensaio (CV %)
negativo	0,499	3,4	0,467	9,9
no valor limite	0,627	4,6	0,580	10,0
positivo forte	1,263	3,6	1,286	7,7

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgG:

Amostra	Valor médio (OD)	Intra-ensaio (CV %)	Valor médio (OD)	Interensaio (CV %)
no valor limite	0,442	4,5	0,423	13,8
positivo forte	1,513	2,4	1,514	11,0
positivo forte	1,615	3,1	1,599	9,8

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgM:


Amostra	Valor médio (OD)	Intra-ensaio (CV %)	Valor médio (OD)	Interensaio (CV %)
no valor limite	0,342	5,8	0,346	13,0
no valor limite	0,371	4,7	0,385	9,9
positivo	0,658	5,5	0,661	9,2

## 10 MEDIDAS DE SEGURANÇA

### 10.1 Advertências e medidas de precaução

O SERION ELISA *classic* destina-se a ser utilizado unicamente por pessoal especializado, que domine por completo as técnicas de trabalho.

A manipulação dos reagentes do teste e das amostras dos pacientes devem seguir os princípios das boas práticas de laboratório.

- Este kit contém componentes de soros humanos. Embora todos os soros de controle sejam negativos para Ac anti-HIV, Ag HBs (antígeno de superfície do vírus da hepatite B) e Ac anti-HCV, eles deverão ser considerados potencialmente infecciosos.
- Não pipetar com a boca.
- Nas áreas onde se trabalha com reagentes de teste ou com amostras de pacientes, não deverá ser permitido comer, beber ou fumar.
- Na manipulação de reagentes do teste e de amostras de pacientes, deve-se utilizar jaleco de laboratório, luvas descartáveis e óculos de proteção. A seguir, lavar muito bem as mãos.
- As amostras dos pacientes e todos os materiais potencialmente infecciosos deverão ser descontaminados após a realização do teste.
- Guardar os reagentes fora do alcance de crianças.
- Solução de parada:  corrosiva (C); causa queimaduras ácidas (R34)

Utilizar óculos de proteção, luvas e jaleco de laboratório.

### 10.2 Eliminação de resíduos

Observar as respectivas disposições legais vigentes.

## 11 LITERATURA

- [1] Blaser, M. J. (1998) *Helicobacter pylori* and associated diseases. *BMJ* 316, 1507-10.
- [2] Heilmann, K. L., Borchard, F. (1991) Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrastructural findings. *GUT* 32, 137-40.
- [3] Kosunen, T. U. *et al.* (1992) Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339, 893-95.
- [4] Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori* – Von der Grundlage zur Therapie Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage, 11-23.
- [5] Malfertheiner, P. *et al.* (1997) Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Eur. J. Gastroent. Hep.* 9, 1-2.
- [6] Malfertheiner, P. *et al.* (1998) *Helicobacter pylori* Infektionen und Ulkuserkrankungen. *Chirurg* 69, 239-48.
- [7] Malfertheiner, P. (2004) *Helicobacter pylori* Infection – ein Update 2004. *Deutsch-Medizinische Wochenschrift* 129, 1821-6.
- [8] The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG, 1997): Current European concepts in the Management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut* 41, 8-13.
- [9] Warren, J. R., Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-5.
- [10] Xiang, Z., *et al.* (1995) Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63, 94.
- [11] Yamaoka, Y. *et al.* (1999) Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* 52, 215-8.





# Aktualizace

Věnujte, prosím, pozornost rozdílům při porovnání s předchozí verzí

**Číslo aktuální verze:** V 13.11/12-1

**Předchozí verze:** V 12.10/01-1

**Aktualizace v odstavci:** Celková aktualizace, 5, 7.2.1

## **SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM**

### **OBSAH**

- 1 POUŽITÍ**
- 2 DIAGNOSTICKÁ RELEVANCE**
- 3 PRINCIP TESTU SERION ELISA *classic***
- 4 SLOŽENÍ KITU**
- 5 POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ PŘEDMĚTEM DODÁVKY**
- 6 UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA**
- 7 SERION ELISA *classic* - POSTUP PŘI TESTU**
  - 7.1 Důkaz o zhoršení kvality
  - 7.2 Příprava vzorku a uchovávání
  - 7.3 Příprava reagensů soupravy
  - 7.4 Přehled – pracovní postup
  - 7.5 Postup při ručním zpracování testu:
  - 7.6 Postup při automatickém zpracování testu
  - 7.7 Pozitivní kontrola/kontrola přesnosti
- 8 HODNOCENÍ TESTU**
  - 8.1 Jednobodová kvantifikace pomocí metody 4PL
  - 8.2 Kritéria validity
  - 8.3 Výpočet SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM
  - 8.4 Meze kvantifikace
  - 8.5 Hraniční rozpětí
  - 8.6 Interpretace výsledků
  - 8.7 Referenční rozsah zdravých jednotlivců
- 9 CHARAKTERISTIKY VÝSLEDKŮ**
  - 9.1 Citlivost a specifita
  - 9.2 Reprodukovatelnost
- 10 BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**
  - 10.1 Výstražná upozornění
  - 10.2 Likvidace
- 11 ODKAZY**



# SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

## Enzymová imunoanalýza ke stanovení humánních protilátek pro použití v diagnostice *in vitro*

SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgA	Kat. č.:	ESR118A
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgG	Kat. č.:	ESR118G
SERION ELISA <i>classic</i> Helicobacter pylori IgM	Kat. č.:	ESR118M

### 1 POUŽITÍ

Testy SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA, IgG a IgM jsou kvantitativní a kvalitativní imunoanalýzy k detekci humánních protilátek proti *Helicobacter pylori* v séru nebo plazmě. Samostatná detekce jednotlivých tříd imunoglobulinů nabízí potvrzení kontaktu s patogenem a určení stádia onemocnění.

### 2 DIAGNOSTICKÁ RELEVANCE

*Helicobacter pylori* je gramnegativní bakterie spirálovitého tvaru, která je vysoce motilní díky tomu, že má až sedm bičíků. Mikrobiologická identifikace je založena na pozitivních testech urey, katalázy a oxidázy a dále nepřítomnosti hydrolýzy hippurátu a nitrát reduktázy.

*Helicobacter pylori* je vysoce specifický z hlediska hostitelských organismů. Další druhy *Helicobacter* se objevují u různých savců, například koček, psů, prasat a myší.

Fenotypové rozdíly mezi izoláty *H. pylori* se výlučně vztahují na expresi/neexistující expresi vakuolizačního cytotoxinu (VacA) a druhého toxinu, který je kódován genem spojeným s cytotoxinem (CagA). Virulentní (typ I) a nevirulentní (typ II) kmeny *Helicobacter* lze rozlišit právě díky těmto fenotypovým rozdílům.

Pacienti s duodenálními vředy častěji trpí infekcí kmeny *H. pylori* typ I s expresí VacA a CagA. Existují však studie, které se domnívají, že je nepravděpodobný kauzální vztah mezi infekcí *Helicobacter* a s s tím spojeného syndromu onemocnění karcinomu žaludku díky kmenům *Helicobacter* produkujících VacA a CagA.

Mechanismus přenosu z osoby na osobu pro *H. pylori* není stále zcela osvětlen. Publikovaná literatura považuje orální a fekálně-orální cestu za pravděpodobnou. Infekce *H. pylori* se dělí do dvou odlišných skupin, a to na akutní a chronické, kdy 80 až 90 % všech případů gastritidy bylo vysledovatelných jako infekce *H. pylori*.

Onemocnění spojená s infekcemi *H. pylori* (tj. ty, které lze vystopovat zpětně ke gastritidě vyvolané *H. pylori*) jsou ulcus duodeni (95 %), ulcus ventriculi (90 %) a MALT (Mucosa Associated Lymphatic Tissue) lymfom (60 až 70 %). Osobám trpícím chronickými infekcemi *Helicobacter pylori* hrozí šestkrát vyšší riziko onemocnění MALT lymfomem v porovnání s ostatními zdravými osobami.

Při diagnóze infekcí *H. pylori* se rozlišují invazivní a neinvazivní techniky. K invazivním metodám patří histologie, rychlý ureázový test (např. test CLO), mikrobiologické postupy jako kultivační nebo molekulární biologické testy (PCR). Dechová zkouška pomocí značené močoviny C<sup>13</sup> a sérologické testy patří do skupiny neinvazivních metod.

Evropská doporučení pro léčbu infekcí *Helicobacter pylori* byla vypracována Evropskou studijní skupinou pro *Helicobacter pylori* (EHPSG) v rámci „Maastrichtské konference o konsensu“ v roce 1997. U všech pacientů pozitivních na *H. pylori* se vředy se doporučovala eradikační terapie, „trojkombinační terapie“. Dále by neinvazivními metodami, např. sérologií, měli být vyšetřováni všichni dyspeptičtí pacienti mladší 45 let bez varovných příznaků a v případě pozitivních výsledků by se rovněž měli léčit.

Detekce protilátek v séru lze použít k terapeutické kontrole po eradikační léčbě. V tomto případě by měla před zahájením takových kontrolních měření titru protilátek uplynout doba šesti měsíců, aby se zajistilo, že lze detekovat významné změny titru. Konkrétně v případě IgG by se měla vzít v úvahu možnost perzistence po dobu měsíců nebo let a to klade omezení na informace získané z čistě sérologických kontrolních metod. Pro dodatečnou kontrolu se doporučuje neinvazivní dechový test C<sup>13</sup>.

Infekce související s *Helicobacter* se musí posuzovat v jasném vztahu k věku pacientů. Prevalence na dekádu života roste o 10 % v průmyslově vyspělých oblastech Severní Ameriky a střední Evropy. Celková prevalence populace v této oblasti dosahuje 40 %.

### 3 PRINCIP TESTU SERION ELISA *classic*

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay [enzymová imunosorpční kvantitativní analýza]) je imunologický test, který je zvláště vhodný ke stanovení protilátek v infekční sérologii. Reakce je založena na specifické interakci protilátek s příslušným antigenem. Testovací proužky mikrotitrační destičky SERION ELISA *classic* jsou pokryty specifickými antigeny vyšetřovaného patogenu. Pokud jsou ve vzorku séra pacienta přítomny protilátky, váží se na fixovaný antigen. Sekundární protilátka, která byla konjugována s enzymovou alkalickou fosfatázou, detekuje imunitní komplex a váže se na něj. Poté je bezbarvý substrát p-nitrofenylfosfát přeměněn na barevný produkt p-nitrofenol. Intenzita signálu tohoto reakčního produktu je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku a měří se fotometricky.

#### 4 SLOŽENÍ KITU

Složky testu	Kusy/ objem
<b>Oddělené proužky mikrotitračního testu, každý s osmi oddělitelnými jamkami potaženými antigenem,</b> (společně 96) [MTP], 1 rámeček Materiál pro potažení je inaktivován	12 kusů
<b>Standardní sérum (připravené k použití) [STD],</b> Lidské sérum ve fosfátovém pufru s proteinem; negativní na protilátky proti HIV, HBs-Ag (povrchový antigen viru hepatitidy B) a proti HCV; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný; zbarvení: amaranth O.	2 x 2 ml
<b>Negativní kontrolní sérum (připravené k použití) [NEG],</b> Lidské sérum ve fosfátovém pufru s proteinem; negativní na protilátky proti HIV, HBs-Ag (povrchový antigen viru hepatitidy B) a proti HCV; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný; zbarvení: lisaminová zeleň V	2 ml
<b>Protilátkový konjugát proti humánním IgA, IgG nebo IgM (připravený k použití) [APC],</b> Polyklonální protilátka proti humánním IgA, IgG nebo IgM, Konjugovaná s alkalickou fosfatázou, stabilizovaná roztokem obsahujícím protein; konzervační prostředek: 0,01 % methylisothiazolon, 0,01 % bromnitrodioxan	13 ml
<b>Koncentrát promývacího roztoku (dostačuje pro 1000 ml) [WASH],</b> Roztok chloridu sodného s Tween 20 a 30 mM Tris/HCL, pH 7,4; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný	33,3 ml
<b>Ředící pufr [DILB],</b> Fosfátový pufr obsahující protein s Tween 20; konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný; zbarvení: 0,01 g/l bromfenolová modř	2 x 50 ml
<b>Zastavovací roztok [STOP],</b> 1,2 N hydroxid sodný.	15 ml
<b>Substrát (připravený k použití) [pNPP],</b> Para-nitrofenylfosfát v pufru bez rozpouštědla konzervační prostředek: < 0,1% azid sodný (Substrát v neotevřené lahvi může mít mírně nažloutlé zbarvení, které nesnižuje kvalitu přípravku!)	13 ml
<b>Osvědčení o kontrole kvality se standardní křivkou a vyhodnocovací tabulkou [INFO],</b> (kvantifikace protilátek v IU/ml nebo U/ml).	2 stránky

## 5 POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ PŘEDMĚTEM DODÁVKY

- běžné laboratorní vybavení
- pro detekci IgM: SERION Rf-Absorbent (kat. č. Z200 (20 ml))
- spektrofotometr pro mikrotitrační desky s filtrem, vlnová délka 405 nm, doporučená referenční vlnová délka 620 nm - 690 nm (např. 650 nm)
- inkubátor 37 °C;
- zvlhčovací komora
- destilovaná voda
- Uzavírací svorky (kat. č. VT120)

## 6 UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Reagens	Uchovávání	Stabilita
Mikrotitrační proužky (potažené antigenem)	neotevřené  po otevření při 2 - 8 °C v uzavřeném sáčku z hliníkové fólie s desikantem  <i>Proužky, které se nepoužijí, se musí uložit v suchu v uzavřeném sáčku z hliníkové fólie.</i>	viz datum expirace;  minimální trvanlivost: čtyři týdny;  trvanlivost v případě správného používání a skladování do data expirace
Kontrolní séra /standardní séra	po otevření při 2 - 8 °C	viz datum expirace; 24 měsíců ode dne výroby
Konjugát	roztok připravený k použití při 2 - 8 °C <i>Chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.</i>	viz datum expirace; 28 měsíců ode dne výroby
Ředící pufr	Neotevřený  po otevření při 2 - 8 °C  <i>Zakalené roztoky zlikvidujte.</i>	viz datum expirace; 36 měsíců ode dne výroby 24 měsíců
Promývací roztok	Koncentrát po otevření při 2 - 8 °C pracovní ředění při 2 - 8 °C pracovní ředění při pokojové teplotě <i>Láhve použité pro pracovní ředění se musí pravidelně čistit. Zakalené roztoky zlikvidujte.</i>	viz datum expirace; 2 týdny 1 týden
Substrát	roztok připravený k použití při 2 - 8 °C, chraňte před světlem! <i>Chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.</i> <i>Zlikvidujte, pokud roztok zežloutne (extinkce v porovnání s destilovanou vodou). &gt; 0,25 OD).</i>	viz datum expirace;  36 měsíců ode dne výroby
Zastavovací roztok	Po otevření při pokojové teplotě	viz datum expirace

## 7 SERION ELISA *classic* - POSTUP PŘI TESTU

### 7.1 Důkaz o zhoršení kvality

Při používání kvantitativní imunoanalýzy SERION ELISA *classic* používejte pouze reagentie SERION ELISA *classic*. Složky se nesmí vyměnit za reagentie od jiných výrobců. Standardní a kontrolní séra kvantitativních imunoanalýz SERION ELISA *classic* jsou definovány výlučně pro testovací soupravu, která bude použita, a nesmí se použít v jiných šaržích. Ředící pufr, promývací roztok, substrát a zastavovací roztok lze používat se všemi kvantitativními imunoanalýzami SERION ELISA *classic* bez ohledu na šarži a test.

Pro každou třídu imunoglobulinů existují tři odlišné koncentrace konjugátu: NÍZKÁ, STŘEDNÍ, VYSOKÁ. Klasifikace je uvedena na každém označení následovně:

např. IgG +	konjugát IgG nízké koncentrace
IgG ++	konjugát IgG střední koncentrace
IgG +++	konjugát IgG vysoké koncentrace

Ve vzácných případech je nutné použít speciální konjugát, aby byla zaručena konzistentní kvalita našich výrobků. Speciální konjugáty se vyrábí v samostatné šarži, nejsou označeny symbolem „+“ a nejsou zaměnitelné za jiné.

Věnujte, prosím, velkou pozornost informacím na štítcích!

Pokud zůstanou neotevřené, mohou být všechny složky testů SERION ELISA *classic* používány až do doby uvedené na štítcích, jestliže jsou správně skladovány. Reagentie nepoužívejte po uplynutí data expirace.

Ředění či pozměňování reagentií může způsobit ztrátu citlivosti.

Během skladování a inkubace chraňte reagentie před silným světlem. Reagentie musí být po použití pevně uzavřeny, aby se zabránilo odpařování a kontaminaci.

Sáček z hliníkové fólie mikrotitrační destičky otevřete tak, že oddělíte pouze horní část vyznačené strany, aby bylo zaručeno, že jej bude možné znovu správně uzavřít. Proužky nepoužívejte, bude-li hliníkový sáček poškozen nebo nebude-li sáček obsahující zbývající proužky a desikant řádně znovu uzavřen.

Přemístění alikvotních množství ze zkumavek s reagentiemi provádějte aseptickými postupy, aby se zabránilo kontaminaci. Aby nedošlo k falešně pozitivním výsledkům, dbejte na to, aby při pipetování konjugátu nedošlo ke kontaktu s horní částí stěn jamek ani k jejich zkrápění. Dávejte pozor na to, aby se nepomíchaly láhve nebo ampulky.

Reprodukovatelnost výsledků testu je závislá na důkladném promíchání reagentií. Před použitím důkladně protřepejte lahvičky obsahující kontrolní séra a stejně tak postupujte u všech vzorků po naředění (např. pomocí vortexu).



Dbejte na pečlivé pipetování a dodržování stanovených inkubačních časů a teplot. Významné časové rozdíly mezi pipetováním do první a poslední jamky mikrotitrační desky při dávkování vzorků/kontrolních sér, konjugátu či substrátu, mohou vést k různým „předinkubačním“ dobám, které mohou ovlivnit přesnost a reprodukovatelnost výsledků.

Optimálních výsledků lze dosáhnout pouze v případě, že budete pokyny přesně dodržovat.

Kvantitativní imunoanalýza SERION ELISA *classic* je platná pouze v případě, že budou splněna hodnotící kritéria specifická pro danou šarži, uvedená na osvědčení o kontrole kvality.

Adekvátní promývání zabraňuje nespecifickým výsledkům testů. Proto je zapotřebí při promývání postupovat pečlivě. Všechny jamky s plochým dnem se musí naplnit stejným objemem promývacího pufru. Na konci promývání dbejte na to, aby byl z jamek odstraněn veškerý promývací pufr, a aby nedošlo k efektům nekontrolovaného ředění. Zabraňte vzniku pěny!

Dbejte na to, abyste nepoškodili popis (patogen/třída protilátek) na prouzcích mikrotitračních testů během promývání a odsávání, jinak by mohlo dojít k záměně.

## 7.2 Příprava vzorku a uchovávání

Lipemické, hemolytické nebo ikterické vzorky (sérum nebo plazma) by se měly testovat velmi opatrně. Očividně kontaminované vzorky by se testovat neměly. Mezi vhodné vzorky patří sérum nebo plazma (EDTA, citrát, heparin) odebrané podle standardních laboratorních postupů. Vzorky se nesmí tepelně inaktivovat.

### 7.2.1 Ředění vzorků

Před prováděním testu se musí vzorky od pacienta naředit ředícím pufrům ( $V_2$ ) následujícím způsobem:

#### SERION ELISA *classic*, *Helicobacter pylori* IgG/IgA

$V_1 + V_2 = 1 + 100$	přidejte	10 $\mu$ l	vzorku od pacienta
	k	1000 $\mu$ l	ředícího pufru

Po naředění a před pipetováním na mikrotitrační destičku se vzorky musí důkladně promíchat, aby vznikl homogenní roztok.

## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM

### Interference revmatoidního faktoru

Revmatoidní faktory jsou autoprotilátky převážně třídy IgM, které se přednostně vážou na imunitní komplexy IgG. Přítomnost nespecifických protilátek IgM (revmatoidních faktorů) může vést k falešně pozitivním výsledkům v imunoanalýze IgM. Navíc je možné, že slabě se vážící, patogen specifické IgM protilátky jsou vytěsněny IgG protilátkami se silnější vazbou, což vede k falešně negativním výsledkům pro IgM. Proto je nezbytné vzorky před detekcí IgM předem upravit absorbentem revmatoidního faktoru (SERION RF-Absorben, kat. č.: Z200 (20 ml/100 testů)). Absorpce Rf se provádí inkubací vzorku pacienta buď v ředícím pufru Rf po dobu 15 minut při pokojové teplotě, nebo přes noc při 4 °C. Postup testu je popsán v samostatném návodu k použití.

Před prováděním testu musí být absorbent revmatoidního faktoru ( $V_1$ ) naředěn 4 díly ředícího pufru ( $V_2$ ).

$V_1 + V_2 = V_3 (1 + 4)$	přidejte	200 $\mu$ l	Rf-absorbentu
	k	800 $\mu$ l	ředícího pufru

Vzorky od pacienta ( $V_4$ ) musí být naředěny tímto Rf ředícím pufrům ( $V_3$ ):

$V_4 + V_3 = 1 + 100$	přidejte	10 $\mu$ l	vzorku od pacienta
	k	1000 $\mu$ l	Rf ředícího pufru

Po naředění a před pipetováním na mikrotitrační destičku se vzorky musí důkladně promíchat, aby vznikl homogenní roztok.

### 7.2.2 Uchovávání vzorků

Vzorky od pacienta by se neměly uchovávat déle než 7 dní při teplotě 2 až 8°C. Při teplotě  $\leq -20$  °C lze dobu uchovávání prodloužit. Chraňte vzorky před opakovaným zmrazováním a rozmrazováním. Naředěné vzorky lze skladovat po dobu jednoho týdne při teplotách od 2 do 8°C.

### 7.3 Příprava reagensí soupravy

Před prováděním testů nechte všechny reagensie dosáhnout pokojové teploty.

#### 7.3.1 Proužky mikrotitračního testu

Proužky mikrotitračního testu v rámečcích jsou zabaleny s desikantem v sáčku z hliníkové fólie. Z rámečku odstraňte nežádoucí jamky a vložte je zpět do hliníkového sáčku. Pečlivě uzavřete sáček, aby se zajistila vzduchotěsnost.

#### 7.3.2 Kontrolní séra /standardní séra

Kontrolní a standardní séra jsou připravena k použití a nesmí se dále ředit. Do každého provedeného testu - nezávisle na počtu použitých proužků mikrotitračního testu- musí být zahrnuto pozitivní kontrolní a standardní sérum. Standardní séra je třeba připravit dvojmo.

Kontrolní séra nezpracovávejte Rf absorbentem.

#### 7.3.3 Protilátkový konjugát proti humánním IgA, IgG nebo IgM (připravený k použití)

Konjugáty se stejnou koncentrací a v rámci stejné třídy imunoglobulinů jsou zaměnitelné. Konjugáty připravené k použití chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.

#### 7.3.4 Promývací roztok

Naředte koncentrát promývacího pufru ( $V_1$ ) 1:30 destilovanou vodou na konečný objem  $V_2$ .

Příklad:

Koncentrát pufru ( $V_1$ )	Konečný objem ( $V_2$ )
33,3 ml	1000 ml
1,0 ml	30 ml

#### 7.3.5 Ředící pufr pro vzorky (připravený k použití)

#### 7.3.6 Substrát (připravený k použití)

Roztok substrátu připravený k použití chraňte před kontaminací např. použitím sterilních špiček.

#### 7.3.7 Zastavovací roztok (připravený k použití)

## 7.4 Přehled – pracovní postup

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM kvantitativní

V případě detekční IgM absorpce revmatoidního faktoru viz odstavec 7.2.1;  
Inkubace 15 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při teplotě 4 °C.

ředění vzorku<sup>1</sup>  
(vzorky od pacienta)  
1+100

Pipetujte naředěné vzorky a kontrolní séra připravená k použití /  
standardní séra do mikrotitračních jamek (100 µl)



INKUBACE 60 minut /37 °C  
zvlhčovací komora



PROMÝVÁNÍ (4 x 300 µl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Pipetování roztoku konjugátu [APC] (100 µl)



INKUBACE 30 minut /37 °C  
zvlhčovací komora



PROMÝVÁNÍ (4 x 300 µl [DIL] [WASH])<sup>2</sup>



Pipetování roztoku substrátu [pNPP] (100 µl)



INKUBACE 30 minut /37 °C  
zvlhčovací komora



Pipetování zastavovacího roztoku [STOP] (100 µl)



ODEČTENÍ EXTINKCE při 405 nm

<sup>1</sup> Speciální ředící pufrы pro následující testy SERION ELISA *classic*:  
IgG, IgM Borrelia burgdorferi, EBV EA IgG, IgM Parvovirus B19 a IgG, IgM Hantavirus Puumala

<sup>2</sup> Pro ruční použití:  
na konci promývacího procesu vyklepněte destičku na papírový ručník.

## 7.5 Postup při ručním zpracování testu:

1. Umístěte do rámečku **požadovaný počet jamek** a připravte si pipetovací protokol.
2. Do příslušných jamek proužků mikrotitračního testu přidejte **100 µl naředěného vzorku a kontrolní séra připravená k použití**. Jednu jamku nechte volnou pro holý substrát (blank), např.:

IgA/IgG/IgM kvantitativní	
Jamka č.:	
Jamka A1	Holý substrát (blank)
Jamka B1	Negativní kontrolní sérum
Jamka C1	Standardní sérum
Jamka D1	Standardní sérum
Jamka E1	Pacient 1

3. **Inkubace vzorku** po dobu 60 minut (+/- 5 minut) při 37 ° C (+/- 1 ° C) ve zvlhčovací komoře
4. Po inkubaci **promyjte** všechny jamky promývacím roztokem (automatickou promývačkou nebo manuálně):
  - odsajte nebo vytřepete inkubační roztok
  - naplňte každou jamku 300 µl promývacího roztoku
  - odsajte nebo vytřepete promývací pufr
  - opakujte promývací proces 3krát (dohromady 4krát!)
  - vysušte odkapáním mikrotitrační desky na filtračním papíru
5. **Přidání konjugátu**  
**Přidejte 100 µl** konjugátu IgA/IgG/IgM do příslušných jamek (s výjimkou holého substrátu (blanku))
6. **Inkubace substrátu** po dobu 30 minut (+/-1 minuta) při 37 ° C (+/- 1 ° C) ve zvlhčovací komoře.
7. Po inkubaci **promyjte** všechny jamky promývacím roztokem (viz výše)
8. **Přídavek substrátu**  
Přidejte 100 µl roztoku substrátu připraveného k použití do každé jamky (včetně jamky pro holý substrát (blank)!)
9. **Inkubace substrátu** po dobu 30 minut (+/-1 minuta) při 37 ° C (+/- 1 ° C) ve zvlhčovací komoře.
10. **Zastavení reakce**  
Přidejte 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky, jemně třepejte mikrotitrační destičkou pro lepší promíchání.
11. **Odečtení extinkce**  
Odečtěte optickou denzitu (OD) během 60 minut při vlnové délce 405 nm proti holému substrátu (blanku), referenční vlnová délka 620 nm a 690 nm( např. 650 nm).

\* Prosím, nezapomeňte, že za zvláštních pracovních podmínek může být v laboratoři nezbytná vnitřní úprava inkubační doby.

## 7.6 Postup při automatickém zpracování testu

SERION ELISA je vhodná pro zpracování na automatech, vyhodnocení použití pomocí přístroje Immunomat™ i DYNEX DSX® a DS2®. Automatické zpracování se provádí analogicky jako při manuálním použití. Prosím, nezapomeňte, že za zvláštních pracovních podmínek může být v laboratoři nezbytná vnitřní úprava inkubační doby.

## 7.7 Pozitivní kontrola/kontrola přesnosti

Pro stanovení přesnosti a spolehlivosti průběhu testů SERION ELISA *classic* a periodické ověření testovací metody doporučujeme používat SERION ELISA *controls*, aby byly splněny požadavky vnitřních systémů řízení kvality laboratoře. Používání SERION ELISA *controls* je popsáno v příslušných návodech k použití.

## 8 HODNOCENÍ TESTU

### SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

#### 8.1 Jednobodová kvantifikace pomocí metody 4PL

Optimalizované přiřazení extinkčních signálů kvantitativním hodnotám je zaručeno použitím nelineárních funkcí, které upravují esovitou křivku bez jakékoliv další transformace hodnot OD. Určení koncentrací protilátek pomocí metody SERION ELISA *classic* se provádí logisticko-logaritmickým modelem (4 PL, čtyřparametrová), která je ideální pro přesné stanovení křivky. Je založena na vzorci:

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{koncentrace})}}$$

Parametry A, B, C a D jsou pro přesný tvar křivky vypovídající:

- |                    |              |
|--------------------|--------------|
| 1. dolní asymptota | ⇒ parametr A |
| 2. Sklon křivky    | ⇒ parametr B |
| 3. bod zlomu       | ⇒ parametr C |
| 4. horní asymptota | ⇒ parametr D |

U každé šarže se vyhodnocuje standardní křivka v Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg, Německo) pomocí opakovaných testů za optimálních podmínek. Není tedy nutné, aby uživatel prováděl časově náročnou a nákladnou konstrukci standardní křivky.

Každá testovací souprava SERION ELISA *classic* obsahuje specifickou standardní křivku pro hodnocení koncentrací protilátek a specifickou hodnotící tabulku pro danou šarži. Na požádání je k dispozici hodnotící software SERION *evaluate* společně se softwarovým nástrojem SERION *activity*, který je založen na programu Microsoft® Excel.

Při každém individuálním testu se používá standardní sérum pro kompenzaci běžných odchylek testu a rovněž pro kontrolu průběhu testu. Pro toto kontrolní sérum stanoví kontrola kvality výrobce referenční hodnotu s rozmezím validity. V tomto rozmezí je zajištěna správná kvantifikace koncentrace protilátek.

## 8.2 Kritéria validity

- OD holého substrátu (blanku) musí být  $< 0,25$
- Negativní kontrola musí dát negativní výsledek testu.
- Při použití kvantitativních testů SERION ELISA *classic* musí být průměrná hodnota OD standardního séra (po odečtení holého substrátu (blanku)!) v rozmezí validity , které je určeno konkrétním osvědčením kontroly kvality pro danou šarži
- Odchylka hodnot OD standardního séra nesmí být vyšší než 20 %.

Pokud tato kritéria nebudou splněna, test není platný a musí být opakován.

## 8.3 Výpočet SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA/IgG/IgM

### 8.3.1 Neautomatizované hodnocení

Pro hodnocení testu SERION ELISA *classic* je k testovací soupravě přidáno osvědčení kontroly kvality specifické pro danou šarži se standardní křivkou společně s vyhodnocovací tabulkou, aby bylo možné získaným hodnotám OD přiřadit odpovídající aktivity protilátek. Hodnota holého substrátu (blanku) musí být před vyhodnocováním odečtena od všech hodnot OD.

#### **Metoda 1:** Kvalitativní hodnocení

Pro určení horní a dolní hranice normálních hodnot (cut-off hodnota) vynásobte průměrnou hodnotu naměřené standardní OD číselnými údaji z osvědčení o kontrole kvality (viz speciální případové vzorce), např.:

$OD = 0,502 \times MW(STD)$  horní hranice normálních hodnot

$OD = 0,352 \times MW(STD)$  dolní hranice normálních hodnot

Jestliže je naměřená průměrná hodnota absorpance standardního séra 0,64, rozsah horní a dolní hranice normálních hodnot (cut-off) je 0,225 až 0,321.



## Metoda 2:

Průběžné stanovení aktivit protilátek pomocí standardní křivky.

Takzvané odchylky mezi analýzami (odchylky mezi jednotlivými dny a odchylky mezi laboratořemi) se kompenzují vynásobením aktuálně naměřené hodnoty, získané ze vzorku od pacienta, korekčním faktorem F. Tento faktor se vypočítá následovně:

$$F = \frac{\text{Referenční hodnota OD (standardního séra)}}{\text{Aktuální hodnota OD (standardního séra)}}$$

Je nezbytné upravit aktuální úroveň testu uživatele pomocí standardní křivky specifické pro jednotlivou šarži. Za prvé se musí denní odchylky opravit vypočítáním korekčního faktoru F:

1. Musí se vypočítat průměr dvou hodnot OD standardního séra a zkontrolovat, zda je v daném validačním rozmezí hodnot.
2. Výpočet faktoru F: daná referenční hodnota se vydělí průměrnou extinkcí standardního séra:  
 $F = \text{referenční hodnota extinkce standardního séra} / \text{průměrná hodnota extinkce standardního séra}$
3. Všechny naměřené hodnoty vzorků od pacienta se vynásobí F.
4. Aktivity protilátek v IU/ml nebo U/ml lze určit ze standardní křivky pomocí opravených hodnot.

### 8.3.2 Automatické hodnocení testu pomocí softwaru SERION *evaluate*

Po zadání čtyř parametrů a referenční hodnoty standardního séra, se aktivity protilátek vypočítají online ze zpracovaných a naměřených průběhů testu SERION ELISA *classic* pomocí softwaru SERION *evaluate*.

Jestliže je optická densita standardu mimo rozmezí validity, objeví se následující hlášení: „Standardní hodnoty mimo rozmezí v následujících skupinách: Skupina 1-24.“ nebo „Standardní hodnota se liší o více než 20 % v následujících skupinách: Skupina 1-24.“

V těchto případech je průběh testu neplatný a měl by být opakován.

Parametry a referenční hodnota se musí změnit pouze v případě, že došlo ke změně šarže (vyhodnocovací tabulka ukazuje parametry a referenční hodnoty). Správné zadání údajů specifických pro danou šarži lze zkontrolovat na základě aktivity standardního séra (v IU/ml nebo U/ml) přiřazené standardnímu séru. Vypočítaná průměrná hodnota jednotek musí odpovídat jednotkové hodnotě uvedené na osvědčení specifickém pro danou šarži. U naměřených hodnot se provádí automatická oprava. Ve standardní verzi je na výtisku uvedeno následující:

Kód vzorku Hodnota OD IU/ml nebo U/ml Vyhodnocení
--

### 8.4 Meze kvantifikace

Meze kvantifikace jsou uvedeny na osvědčení kontroly kvality testu SERION ELISA *classic*. Linearita ředění byla v tomto rozsahu prokázána komplexními hodnotícími studii. V případě, že vzorek pacienta dává výsledek testu nad horní mezí kvantifikace, vzorek lze testovat při vyšším ředění. Takto stanovená aktivita protilátek se musí vynásobit faktorem dodatečného ředění.

### 8.5 Hraniční rozpětí

Hraniční rozpětí testu SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA/IgG/IgM jsou stanovena na osvědčení kontroly kvality a indikují rozpětí hraničních výsledků testů. Hodnoty získané při testování vzorku pacienta, které jsou nižší než toto rozpětí, indikují negativní výsledek testu; hodnoty nad hraničním rozpětím jsou vykládána jako pozitivní. V případě, že výsledky budou v rámci hraničního rozpětí, definitivní interpretace výsledků není možná. V takových případech je test třeba opakovat souběžně s následujícím vzorkem odebraným o 1 až 2 týdny později.

## 8.6 Interpretace výsledků

Pozitivní výsledky testu SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG, IgA a IgM indikují přítomnost specifických protilátek proti *Helicobacter pylori*. Pozitivní sérologický výsledek by měl být vždy interpretován s ohledem na anamnézu pacienta a klinický obraz, protože pozitivní výsledek s konečnou platností nerozlišuje mezi stavem akutního onemocnění a protilátkami přítomnými kvůli mírám séroprevalence v celkové populaci. Negativní výsledek je však projevem séronegativního stavu pacienta. V případě klinického podezření na infekci však takové negativní výsledky nevylučují možnost infekce, protože vzorek může být odebrán příliš brzy na to, aby byly protilátky detekovatelné. V takových případech by se další vzorek měl odebrat přibližně za dva týdny.

Sérologie *Helicobacter* by se neměla provádět pouze se zaměřením na detekci protilátek IgG, protože lze u 2 až 7 % pacientů s akutní infekcí *Helicobacter pylori* nalézt konstelaci protilátek IgG-negativní/IgA-pozitivní. Na druhé straně 15 až 35 % pacientů s akutní infekcí *Helicobacter pylori* nevytváří patogen specifické IgA, proto je stanovení diagnózy možné pouze detekcí alternativních tříd imunoglobulinů. Proto je třeba provádět sérologii *Helicobacter* současně jak pro IgG, tak IgA. Následující schémata protilátek lze interpretovat takto:

**Tabulka 1: Interpretace různých schémat protilátek v sérologii *Helicobacter***

IgM	IgA	IgG	interpretace
-	-	-	séronegativní stav, v případě klinických příznaků je třeba odebrat kontrolní séra o 2 týdny později
+/-	-	+	séropozitivní stav po kontaktu s antigenem nebo aktivní infekci s chybějící odezvou IgG, séroprevalence závisí na věku pacienta („nákaza“)
-	-	+	
+/-	+	+	podezření na aktivní infekci <i>H. pylori</i> ; typický obraz reakce u pacientů s (aktivní) gastritidou
+/-	+	-	podezření na aktivní infekci <i>H. pylori</i> , chybějící odezva IgG (2 až 7 % případů)

## 8.7 Referenční rozsah zdravých jednotlivců

Testování náhodných sér dárců krve shromážděných v oblasti jižního Německa testy SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA, IgG a IgM poskytlo následující rozdělení. Ze 47 sér testovaných testem SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgA bylo 39 (83,0 %) negativních, pět sér (10,6 %) reagovalo pozitivně a tři séra (6,4 %) byla považována za hraniční. Z těchto 47 sér v případě testování testem SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG bylo 41 (87,2 %) negativních, čtyři (8,5 %) séra dala pozitivní výsledek a dvě séra (4,3 %) byla hodnocena jako hraniční. Kromě toho výsledky testování 47 sér v testu SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgM byly následující: 35 (74,5 %) testovaných sér bylo negativních, šest sér (12,8 %) bylo pozitivních a šest (12,8 %) sér byla hraničních.

## 9 CHARAKTERISTIKY VÝSLEDKŮ

### 9.1 Citlivost a specifičnost

#### SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG:

Pro zjištění charakteristiky chování SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG bylo prozkoumáno 88 sér. Z nich bylo 41 od náhodných dárců krve a 47 sér pocházelo od pacientů s podezřením na infekci *Helicobacter* podpořenou výsledky předchozího testu. Tato séra byla testována testem SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* IgG a společně s dalšími dvěma komerčně dostupnými testy byly získány následující data.

SERION ELISA <i>classic</i> <i>Helicobacter pylori</i> IgG	Citlivost	Specifičnost
Údaje charakteristiky versus ELISA 1	96,6 %	94,3 %
Údaje charakteristiky versus ELISA 2	91,1 %	> 99 %

Navíc byla provedena externí studie ve Francii prostřednictvím AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé). Zde bylo celkem vyšetřeno 92 sér. 44 ze 45 vzorků od pacientů s prokázanou infekcí *Helicobacter* bylo správně identifikováno pomocí testu SERION ELISA *classic* *Helicobacter pylori* zatímco jedno sérum bylo identifikováno jako hraniční. 42 ze 47 vzorků séra od prokazatelně neinfekčních jedinců bylo zaznamenáno jako negativních, 2 jako hraniční a tři séra byla falešně pozitivní. Tyto výsledky podporují výsledky interní studie. Podrobné výsledky této externí studie jsou k dispozici na internetu na adrese <http://www.afssaps.fr>

## SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA:

Pro vyhodnocení SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA bylo celkem testováno 146 vzorků séra. Sérová skupina 1 se skládala z 54 sér náhodných dárců krve, zatímco skupina 2 obsahovala 87 sér pacientů podstupujících gastrokopii, jejichž bioptický materiál měl pozitivní test na ureázu (test CLO) a byla charakterizována jako *H. pylori* pozitivní na základě histologických testů. Dále bylo na křížové reakce testováno 5 vzorků séra od pacientů s protilátkami proti *Campylobacter jejuni*.

Vzorky byly testovány testem SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA a porovnávaly se se 4 dalšími komerčně dostupnými testy ELISA (testy A-D). Testy vykazující nesrovnalosti (tj. jakákoliv séra, která nedávala stejné výsledky v nejméně 4 z 5 testů ELISA) byly vyhodnocovány pomocí komerčně dostupného testu immunoblot.

### Výsledky: Sérová skupina 1:

Test	Korelace	Prevalence	Citlivost	Specifičnost
SERION ELISA <i>classic</i>	96,0 %	20,0 %	80,0 %	100 %
ELISA A	93,0 %	16,3 %	100 %	91,7 %
ELISA B	93,9 %	20,4 %	80,0 %	97,4 %
ELISA C	84,3 %	19,6 %	20,0 %	100 %
ELISA D	95,7 %	19,1 %	88,9 %	97,4 %

Celkem bylo deset sér určeno jako pozitivní. Osm sér bylo v testu SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori a ELISA B a D pozitivních. ELISA A byla nejcitlivějším testem, avšak tři séra byla v hraniční oblasti a pro statistické výpočty se nepoužívala. Ve výpočtech prevalence nedošlo k žádným významným rozdílům.

### Výsledky: Sérová skupina 2:

Test	Korelace	Prevalence	Citlivost	Specifičnost
SERION ELISA <i>classic</i>	91,3 %	59,4 %	85,4 %	100 %
ELISA A	82,2 %	67,1 %	100 %	45,8 %
ELISA B	88,9 %	61,1 %	81,8 %	100 %
ELISA C	86,3 %	65,0 %	78,8 %	100 %
ELISA D	89,5 %	63,2 %	83,3 %	100 %

U SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA a testů ELISA B - D bylo zjištěno jasně negativních 28 sér z 87 po sobě odebraných sér. U ELISA A 13 z těchto sér dávalo pozitivní výsledky. Prevalence udává podíl pozitivních výsledků v sérových skupinách. Vypočítaná citlivost je po porovnání nižší než u IgG ELISA. Je to částečně způsobeno tím, že imunitní odezva IgA je primárně směřována proti CagA a proteinům ureázy B z *H.pylori*, zatímco odezva IgG je směřována proti úplnému proteinovému komplementu organismu.

Pozorované rozdíly v odezvách protilátek IgG a IgA je kromě skutečnosti, že protein B ureázy převážně odpovídá za nespecifickou vazbu protilátek, pravděpodobnou příčinou nižší korelace stanovení IgA a zvláště za to, že je srovnání ELISA a immunoblot možné

pouze částečně. Tato studie zdůrazňuje důležitost detekce protilátek IgA při diagnóze infekcí *H. pylori* a prokazuje 2 až 5krát vyšší prevalenci protilátek IgA u pacientů s potvrzenou infekcí (sérová skupina 2) v porovnání s normální populací (sérová skupina 1). Zkřížené reakce na *Campylobacter jejuni* nebyly u SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA pozorovány (testováno pět sér). Tak tomu bylo i v případě ELISA B až D, zatímco u ELISA A bylo jako pozitivní zaznamenáno jedno sérum.

Když se zahrne všech 146 sér, vypočítané charakteristiky chování pro SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgA jsou citlivost 84,3 % a specifická 100 % při nejlepším výsledku korelace 93,5 %. Pouze ELISA A měla citlivost 100 % a bylo to na úkor nízké specifické 73,8 %. ELISA B a D jsou srovnatelné s testem SERION ELISA *classic*, kdy jsou citlivosti 81,5 % a 84,2 % a specifické 98,6 % a 100 % v příslušných případech. ELISA C měla nejhorší citlivost 69,4 % (100 % specifická).

### **SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM**

Pro vyhodnocení SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM bylo celkem testováno 186 vzorků séra. Sérová skupina 1 obsahovala 45 náhodných sér od dárců krve, zatímco sérová skupina 2 obsahovala 119 sér s prokázanou infekcí. Třetí sérový panel, skupina 3, se skládala ze 6 sér od pacientů s protilátkami proti *Campylobacter jejuni*, 7 séropozitivních sér *Chlamydia spec.*, 3 s protilátkami proti *Borrelia burgdorferi*, 3 s protilátkami proti *Legionella pneumophila* a 1 sérum s protilátkami proti *Brucella spec.* a dále 10 sér se zvýšenou aktivitou revmatoidního faktoru.

Vzorky byly testovány testem SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM a porovnávaly se se dvěma dalšími komerčně dostupnými testy ELISA. Zatímco byly k dispozici pouze dva srovnatelné testy ELISA adekvátní kvality a žádný immunoblot, pozitivní výsledky byly dodatečně testovány u testů IgG a IgA ELISA. Pro stanovení citlivosti a specifické bylo provedeno přímé srovnání komerčního testu a SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM.

3,2 % vzorků séra (6/186) reagovalo pozitivně přinejmenším u SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM a u jednoho dalšího testu ELISA, podobně šest testovaných sér bylo přinejmenším na jedné další mezní hodnotě ELISA. Mezinárodně vydávaná literatura uvádí pozitivní míru IgM v obecné populaci od 1 % do 11 %, což potvrzují výsledky získané v této studii. Celkem bylo vyhodnocováno 98 (140) sér jako negativních ve všech ELISA (nejméně ve dvou ELISA). To se rovná 52,7 % (75,3 %). Žádný vzorek nereagoval pozitivně ve všech třech testech ELISA, ačkoliv sedm reagovalo na mezních hodnotách přinejmenším se dvěma testy ELISA (3,8 %). Celkem reagovalo nejméně 59 sér (31,7 %) na hraniční úrovni nejméně v jednom testu. 186 sér SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM v porovnání se dvěma dalšími testy ELISA udávalo citlivost 100 % a v porovnání s ELISA A specifická 80,1 % (korelace 80,3 %) a v porovnání s ELISA B specifická 75,5 % (korelace 76 %). Snížené citlivosti jsou výsledkem toho, že žádný ze srovnávacích testů nerozpoznal žádná pozitivní séra, proto srovnání citlivostí mezi těmito dvěma testy nebylo možné. Pokud se do výpočtů zahrne pouze 45 sér dárců krve, pak se citlivosti a korelace zvyšují téměř o 10 %. Je nutné uvést, že 45 sér dárců krve bylo v dřívějších studiích vyhodnoceno a označeno jako pozitivní. U 17 ze 119 pacientů byly zaznamenány nezávislé pozitivní výsledky testů. ELISA A zaznamenala společně s SERION ELISA *classic* Helicobacter pylori IgM celkem jedno pozitivní sérum a ELISA B pět. Protilátky IgM jsou často doprovázeny protilátkami IgG.

## 9.2 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost uvnitř stanovení (intra-assay) byla stanovena testováním sér různé reaktivity dvacetkrát v průběhu jednoho testu. Reprodukovatelnost mezi stanoveními (inter-assay) byla stanovena testováním sér různé reaktivity desetkrát v 10 nezávislých analýzách prováděných v 5 různých dnech.

$$\text{Variační koeficient (CV \%)} = \frac{\text{Směrodatná odchylka}}{\text{Průměrná hodnota OD}} \times 100$$

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgA:

Vzorek	Průměrná hodnota (OD)	Intra-assay (CV %)	Průměrná hodnota (OD)	Inter-assay (CV %)
negativní	0,499	3,4	0,467	9,9
mezní	0,627	4,6	0,580	10,0
silně pozitivní	1,263	3,6	1,286	7,7

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgG:

Vzorek	Průměrná hodnota (OD)	Intra-assay (CV %)	Průměrná hodnota (OD)	Inter-assay (CV %)
mezní	0,442	4,5	0,423	13,8
silně pozitivní	1,513	2,4	1,514	11,0
silně pozitivní	1,615	3,1	1,599	9,8

### SERION ELISA classic Helicobacter pylori IgM:


Vzorek	Průměrná hodnota (OD)	Intra-assay (CV %)	Průměrná hodnota (OD)	Inter-assay (CV %)
mezní	0,342	5,8	0,346	13,0
mezní	0,371	4,7	0,385	9,9
pozitivní	0,658	5,5	0,661	9,2

## 10 BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

### 10.1 Výstražná upozornění

SERION ELISA *classic* je určena k používání kvalifikovaným personálem, který je obeznámen se správnou laboratorní praxí.

Se všemi reagensii v soupravě a vzorky humánních biologických materiálů se musí pečlivě nakládat s uplatněním zásad zavedené správné laboratorní praxe.

- Tato souprava obsahuje složky lidské krve. Ačkoliv všechna kontrolní séra a séra pro stanovení horní a dolní hranice normálních hodnot (cut-off séra) byla negativní s ohledem na protilátky proti HIV, HBs-Ag (*povrchový antigenu viru hepatitidy B*) a HCV, je zapotřebí je považovat za potenciálně infekční.
- Nepipetujte ústy.
- Nekuřte, nejezte ani nepijte v místech, kde se nakládá se vzorky nebo reagensii v kitu.
- Používejte rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a bezpečnostní brýle při práci s reagensii v kitu nebo se vzorky. Poté si důkladně omyjte ruce.
- Materiál od pacienta a další potenciálně infekční materiál musí být po dokončení testu dekontaminován.
- Reagencie musí být uchovávány na bezpečném místě a chráněny před neoprávněnými osobami. např. dětmi.
- Zastavovací roztok:  žíravý (C), způsobuje poleptání (R34).

Při manipulaci používejte rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a bezpečnostní brýle!

### 10.2 Likvidace

Prosím, dodržujte příslušné zákonné požadavky!



## 11 ODKAZY

- [1] Blaser, M. J. (1998) *Helicobacter pylori* and associated diseases. *BMJ* 316, 1507-10.
- [2] Heilmann, K. L., Borchard, F. (1991) Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrasstructural findings. *GUT* 32, 137-40.
- [3] Kosunen, T. U. *et al.* (1992) Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339, 893-95.
- [4] Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori* – Von der Grundlage zur Therapie Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage, 11-23.
- [5] Malfertheiner, P. *et al.* (1997) Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Eur. J. Gastroent. Hep.* 9, 1-2.
- [6] Malfertheiner, P. *et al.* (1998) *Helicobacter pylori* Infektionen und Ulkuserkrankungen. *Chirurg* 69, 239-48.
- [7] Malfertheiner, P. (2004) *Helicobacter pylori* Infection – ein Update 2004. *Deutsch-Medizinische Wochenschrift* 129, 1821-6.
- [8] The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG, 1997): Current European concepts in the Management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut* 41, 8-13.
- [9] Warren, J. R., Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-5.
- [10] Xiang, Z., *et al.* (1995) Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63, 94.
- [11] Yamaoka, Y. *et al.* (1999) Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* 52, 215-8.

**SERION ELISA classic**

(V 11/12-1)

Symbole auf den Etiketten/ symbols on labels/ symboles et étiquettes/ simboli sulle etichette/ символы на этикетках/símbolos sobre las etiquetas/ σύμβολα στις ετικέτες/ símbolos nos rótulos / Symboly na štítcích / symboler på etiketter/ symboler på etiketterna/ Symbole na etykietach/ symboly na označení/ Simboli na oznakah/ symbol på etiketter



Hersteller/ Manufacturer/ Fabricant/ Produttore/Производитель/ Fabricante/ Κατασκευαστής/ Fabricante/ Výrobce/ Fremstiller/ Tillverkare/ Producent/ Výrobca/ Izdelovalec/ Produsent



Ausreichend für 96 Tests/ sufficient for 96 tests/ suffisant pour 96 tests/ sufficiente per 96 test/ достаточно для 96 тестов / suficiente para 96 pruebas/ επαρκεί για 96 δοκιμασίες/ suficiente para 96 ensaios/ stačí na 96 testů/ nok til 96 test/ tillräckligt för 96 tester/ Wystarcza na 96 testów/ postačuje na 96 testov/ Zadostuje za 96 testov/ Tilstrekkelig til 96 tester



Charge/ lot/ lot / lotto/ lote/ παρτίδα/ lote/ šarže/ lot/ lot/ seria/ šarža/ serija/ lot /lot



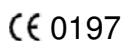
Referenz oder Bestellnummer/ reference or order number/ numéro de référence ou de commande/ numero di riferimento o ordinazione/ ссылка или номер для заказа / referencia o número de pedido/ Αριθμός αναφοράς ή παραγγελίας/ referència ou número para encomenda/ reference nebo číslo objednávky/ reference eller bestillingsnummer/ referens eller beställningsnummer/ Numer referencyjny lub numer zamówienia/ referenčné číslo alebo číslo objednávky/ referenčna ali kataloška številka/ Referanse eller ordrenummer



Lagern zwischen 2 und 8 Grad Celsius/ store between 2 and 8 degree celsius/ entre 2 et 8 degré celsius/ conservare a temperatura compresa tra 2 e 8 gradi centigradi/ хранить при температуре от 2 до 8 градусов цельсия / conservar entre 2 y 8 grados celsius/ Φύλαξη μεταξύ 2 και 8 βαθμούς Κελσίου/ Armazenar entre 2º e 8º Celsius/ uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C/ opbevares mellem 2 og 8 grader celsius/ förvara vid 2 till 8 grader Celsius/ Przechowywać w temp. pomiędzy 2 a 8 stopni Celsjusza/ skladovať pri teplote 2 až 8 stupňov Celzia/ Shranjujte pri temperaturi od 2 do 8 C/ Oppbevares mellom 2 og 8 grader Celsius



CE-Markierung bei Erfüllung der IVD Richtlinie 98/79 EG/ CE marking according to IVD guideline 98/79 EC/ Étiquetage CE selon les directives DIV/ marcatura CE in conformità alla direttiva IVD 98/79 EC/ маркировка CE согласно директивам IVD 98/79 /marca CE según la directiva IVD 98/79 CE/ Σήμανση CE σύμφωνα με την οδηγία IVD 98/79 EE/ Marcação CE de acordo com a Directiva 98/79/ značení CE podle směrnice IVD 98/79/ES/ CE-mærkning iht. IVD-retningslinje 98/79/EF/ CE-mærkning enligt riktlinjerna för IVD i direktiv 98/79/EC/ Oznakowanie CE zgodne z wytycznymi dot. diagnostyki in vitro 98/79 EC/ označenie CE podľa smernice IVD 98/79/ES/ oznaka CE, skladna s smernico IVD 98/79/ES/ CE-merking i henhold til IVD-retningslinjer 98/79/EØF



CE-Markierung bei Erfüllung der IVD Richtlinie 98/79 EG gemäß Anhang II, Liste B/ CE marking according to IVD guideline 98/79 EC according to annex II, list B/ Étiquetage CE selon les directives DIV 98/79 CE selon l'annexe II, liste B/ marcatura CE in conformità alla direttiva IVD 98/79 EC secondo l'allegato II, elenco B/ маркировка CE согласно директивам IVD 98/79, приложение II, список B / marca CE según la directiva IVD 98/79 CE de acuerdo con el anexo II, lista B/ Σήμανση CE σύμφωνα με την οδηγία IVD 98/79 EE, σύμφωνα με το παράρτημα II, κατάλογο B/ Marcação CE de acordo com a Directiva 98/79/ CE relativo aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*, segundo a lista B do anexo II/ značení CE podle směrnice IVD 98/79/ ES podle příloh II, seznamu B/ CE-mærkning iht. IVD-retningslinje 98/79 /EF iflg. annekts II, liste B/ CE-mærkning enligt riktlinjerna för IVD i direktiv 98/79/EC, bilaga II, lista B/ Oznakowanie CE zgodne z wytycznymi dot. diagnostyki in vitro 98/79 EC, zgodnie z aneksem II, lista B/ označenie CE podľa smernice IVD 98/79 ES v znení dodatku II, zoznam B/ oznaka CE, skladna s smernico IVD 98/79/ES in seznamom B v Dodatku II/ CE-merking i henhold til IVD-retningslinjer 98/79/EØF, tillegg II, liste B



Verfallsdatum/ expiry date/ date d'expiration/ data di scadenza/ срок годности до /fecha de caducidad/ ημερομηνία λήξης/ data de validade/ datum exspirace/ udløbsdato/ förfallodatum/ data upływu ważności/ dátum expirácie/ datum izteka roka uporabnosti/ utløpsdatp





Mikrotiterplatte (brechbare Streifen)/ microtiter plate (breakable strips)/ plaque de microtitration (bandelettes détachables)/ piastra per microtitolazione (strisce separabili)/ микротитровальная панель (отрывные стрипы) /placa de microtitulación (tiras rompibles)/ Πλάκα μικροτιτλοποίησης (αποσπώμενες ταινίες)/ placa de microtitulação (tiras quebráveis)/ mikrotitrační deska (rozlomitelné proužky)/ mikrotiterplade (afbrækkelige strimler)/ mikrotiterplatta (brytbara strips)/ Płytką mikrotitracyjną (paski do odrywania)/ mikrotitračná platnička (rozlomitelné prúžky)/ vsebnik za mikrotitriranje (z razdelki, ki jih je mogoče odlomiti)/ Mikrotiterplatte (avbrytbare strips)



Antigen/ antigen/ Antigène/ antigene/ антиген /antígeno/ αντιγόνο/ antigénio/ antigen/ antigen/ antigen/ Antygen/ antigén/ antigen/ Antigen

- AK** Antikörper/ antibodies/ Anticorps/ anticorpi/ антитела / anticuerpos/ αντίσωμα/ anticorpos/ protilátky/ antistoffer/ antikroppar/ Przeciwciała/ protilátky/ protitelesa/ Antistoffer
- CAG** Kontrollantigen/ control antigen/ antigène de contrôle/ antigene di controllo/ контрольный антиген /antígeno de control/ αντιγόνο ελέγχου/ antígeno de controle/ kontrolní antigen/ kontrolantigen/ kontrollantigen/ antygen kontrolny/ kontrolný antigén/ kontrolni antigen/ kontrollantigen
- STD** Standardserum/ standard serum/ Sérum standard/ siero standard/ стандартная сыворотка /suero patrón/ πρότυπος ορός/ soro padrão/ standardní sérum/ standardserum/ standardserum/ Surowica standardowa/ štandardné sérum/ standardni serum/ Standardserum
- POS** Positivkontrolle/ positive control/ Contrôle positif/ controllo positivo/ положительные контроли /control positivo/ θετικός έλεγχος/ controlo positivo/ pozitivní kontrola/ positiv kontrol/ positiv kontroll/ Kontrola pozytywna/ pozitivna kontrola/ pozitivna kontrola/ Positiv kontroll
- C/O** Grenzwertiges Serum/ cut-off serum/ Sérum seuil/ siero cut-off/ сомнительные сыворотки (пограничные)/suero de corte/ οριακός ορός (cut-off)/ soro *cut-off*/ cut-off sérum/ cutoff-serum/ cutoff-serum/ Surowica „cut-off“/ sérum na určenie hraničnej hodnoty/ mejni serum/ Stopps serum
- NEG** Negativkontrolle/ negative control/ Contrôle négatif/ controllo negativo/ отрицательные контроли /control negativo/ αρνητικός έλεγχος/ controlo negativo/ negativní kontrola/ negativ kontrol/ negativ kontroll/ Kontrola negatywna/ negatívna kontrola/ negativna kontrola/ Negativ kontroll
- APC** Alkalisches Phosphatase Konjugat antihuman/ alkaline phosphatase conjugate anti-human/ conjugué phosphatase alcaline anti-humain/ coniugato con fosfatasi alcalina anti-umano/ античеловеческий щелочной конъюгат фосфатазы / conjugado anti humano de fosfatasa alcalina/ Σύζευξη αλκαλικής φωσφατάσης/ conjugado anti-humano com fosfatase alcalina/ konjugát alkalické fosfatázy anti-humánní/ alkalisk phosphatase konjugat antihumant/ antihumant alkaliskt fosfatas-konjugat/ Anty-ludzki koniugat fosfatazy alkalicznej/ konjugát antihumánnejalkalickej fosfatázy/ konjugat alkalne fosfataze, antihumani/ Alkalisk fosfatase-konjugat, anti-humant
- +** niedrig-konzentriertes Konjugat/ conjugate with low concentration/ conjugué à faible concentration/ coniugato a concentrazione bassa/ конъюгат низкой концентрации /conjugado con concentraci6n baja/ Σύζευξη χαμηλής συγκέντρωσης/ conjugado de baixa concentraç6o/ konjugát s nízkou koncentrací/ konjugat med lav koncentration/ konjugat med låg koncentration/ koniugat o niskim stężeniu/ konjugát so strednou koncentráciou/ konjugat z majhno koncentracijo/ Konjugat med lav konsentrasjon
- ++** mittel-konzentriertes Konjugat/ conjugate with medium concentration/ conjugué à concentration moyenne/ coniugato a concentrazione media/ конъюгат средней концентрации /conjugado con concentraci6n media/ Σύζευξη μέτριας συγκέντρωσης/ conjugado de concentraç6o intermédia/ konjugát se střední koncentrací/ konjugat med medium koncentration/ konjugat med medelhög koncentration/ koniugat o średnim stężeniu/ konjugát so strednou koncentráciou/ konjugat s srednj6 koncent/ Konjugat med middels konsentrasjon
- +++** hoch-konzentriertes Konjugat/ conjugate with high concentration/ conjugué à concentration élevée/ coniugato a concentrazione alta/ высококонцентрированный конъюгат/ conjugado con concentraci6n alta/ σύζευξη υψηλής συγκέντρωσης/ conjugado de elevada concentraç6o/ konjugát s vysokou koncentrací/ konjugat med høj koncentration/ konjugat med hög koncentration/ koniugat o wysokim stężeniu/ konjugát s vysokou koncentráciou/ konjugat z veliko koncentracijo/ Konjugat med høy konsentrasjon
- RF** Rheumafaktor-Absorbens (Rf-Absorbens)/ rheumatoid factor absorbent (rf-absorbent)/ absorbant de facteur rhumatoïde (rf-absorbant)/ adsorbente del fattore reumatoide (adsorbente Rf)/ абсорбент ревматоидного фактора (Rf-абсорбент) /adsorbente de factor reumatoide (material absorbente de Rf)/ Απορροφητής ρευματοειδούς παράγοντα (απορροφητής Rf)/ absorbente de factor reumatóide (absorbente de Fr)/ absorbent revmatoidního faktoru (rf-absorbent)/ reumafaktor- absorptionsmiddel (rf-absorptionsmiddel)/ reumafaktor-absorptionsmedel (rf-absorptionsmedel)/ Absorbent czynnika reumatoidalnego (absorbent RF)/ absorbent reumatoidného faktora (absorbent rf)/ absorbent revmatoidnega faktorja (absorbent RF)/ Revmatoid faktor-absorbent (rf-absorbent)
- DILB** Verdünnungspuffer für Serum/ dilution buffer for sera/ sérum pour le tampon de dilution/ tampone di diluizione per sieri / разбавляющий буфер для сыворотки / solución amortiguadora para los sueros/ ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης για ορούς/ tampão de diluição para soro/ ředici pufr pro séra/ fortyndingsbuffer til sera/ spädningsbuffert för serum/ bufor rozcieńczający do surowic / pufo na riedenie sér/ pufo za redčenje seruma/ Fortynningsbuffer til serum
- DILBS1**
- DILBS2**
- DILBS3**

- WASH** Waschlösungskonzentrat/ washing solution concentrate/ concentré de solution de lavage / soluzione di lavaggio concentrata / промывочный концентрат /concentrado de solución de lavado/ συμπύκνωμα έκπλυσης/ concentrado de solução de lavagem/ koncentrát promývacího roztoku/ vaskeopløsningskoncentrat/ tvättlösningkoncentrat/ Stężony roztwór do płukania/ koncentrát premývacieho roztoku/ koncentrat za raztopino za izpiranje/ Vaskeløsningskonsentrat
- pNPP** pNPP Substrat/ pNPP substrate/ substrat Pnpp/ substrato pNPP/ pNPP субстрат / sustrato pNPP/ Υπόστρωμα pNPP/ substrato pNPP/ pNPP substrát/ pNPP-substrat/ pNPP-substrat/ Substrat pNPP/ substrát pNPP/ substrat pNPP/ pNPP-substrat
- STOP** Stoppløsning/ stopping solution/ solution d'arrêt/ soluzione di arresto/стоп-раствор/ solución de parada/ διάλυμα διακοπής/ solução de paragem/ zastavovací roztok/ stopopløsning/ stoppløsning/ roztwór zatrzymujący reakcję/ ukončovací roztok/ raztopina za ustavitve reakcije/ stoppeløsning
-  ätzend/ corrosive/ corrosif/ corrosivo/ едкий /corrosivo/ διαβρωτικό/ corrosivo/ žíravý/ ætsende/ frätande/ czynnik korozyjny/ korozivne/ jedko/ etsende
-  ätzend/ corrosive/ corrosif/ corrosivo/ едкий /corrosivo/ διαβρωτικό/ corrosivo/ žíravý/ ætsende/ frätande/ czynnik korozyjny/ korozivne/ jedko/ etsende
- INFO** Gebrauchsanweisung, Zertifikat (Standardkurve und Auswertetabelle), CD/ instructions, certificate (standard curve and evaluation table), CD/ instructions, certificat (courbe de référence et tableau d'évaluation), CD/ istruzioni per l'uso, certificato (curva standard e tabella interpretativa), CD/ Инструкция по применению, сертификат (стандартная кривая и таблица для оценки), компактний диск /instrucciones, certificado (curva patrón y tabla de evaluación), CD/ Οδηγίες χρήσης, Πιστοποιητικό (πρότυπη καμπύλη και πίνακας υπολογισμού), CD/ instruções, certificado (curva padrão e tabela de avaliação), CD/ (standardní křivka a vyhodnocovací tabulka), CD/ brugsanvisning, certifikat (standardkurve og evalueringstabel), CD/ instruktioner, certifikat (standardkurva och utvärderingstabel), CD/ Instrukcje, certyfikat (krzywa standardowa i tabela do określania wyników/ CD/ pokyny, certifikát (šstandardná krivka a hodnotiacia tabuľka), disk CD/ navodila, certifikat (standardna krivulja in ocenjevalna tabela), CD/ Instruksjoner, certifikat (standardkurve og evalueringstabel), CD
- RTU** gebrauchsfertig/ ready-to-use/ prêt à l'emploi/ pronto per l'uso/ готовый к использованию /listo para usar/ έτοιμο προς χρήση/ pronto a utilizar/ připravený k použití/ klar til brug/ bruksfærdig/ gotowy do użycia/ pripravené na použitie/ pripravljen za uporabo/ klar til bruk
- CONC** Konzentrat/ concentrate/ concentré/ concentrato/ концентрат / concentrado/ Συμπύκνωμα/ concentrado/ koncentrát/ koncentrat/ koncentrat/ Konzentrat/ koncentrát/ koncentrat/ Konsentrat
- DIL** verdünnen oder lösen in/ dilute or dissolve in/ diluez ou dissoudre dans/ diluire o sciogliere in/ разбавить или растворить в /diluir o disolver en/ αραιώση ή διάλυση σε/ diluir ou dissolver em/ naředte nebo rozpustte v/ fortynd eller opløs i/ späd eller lös i/ Rozcieńczyć lub rozpuścić w/ rozriediť alebo rozpustiť v/ razredčite ali raztopite v/ Fortynnes eller løses opp i
- AQUA** destilliertes Wasser/ aqua detillata/ eau distillée/ acqua distillata/ дистиллированная вода /agua destilada/ αποσταγμένο νερό/ água destilada/ destilovaná voda/ destilleret vand/ destillerat vatten/ woda destylowana/ destilovaná voda/ destilirana voda/ Destillert vann
- IVD** In-vitro Diagnostik Anwendung/ in-vitro diagnostic use/ utilisation en diagnostic in-vitro/ uso diagnostico in vitro/ использование в диагностике ин-витро /uso diagnóstico in-vitro/ Διάγνωση, χρήση in-vitro/ para diagnóstico in vitro/ diagnostické použitie in-vitro/ til in-vitro diagnostik/ in vitro-diagnostisk användning/ do diagnostyki in vitro/ diagnostické použitie in-vitro/ uporaba pri diagnostiki in vitro/ In vitro-diagnostisk bruk

**SERION ELISA classic**

102	Masern Virus / Measles Virus / Rougeole	1262	Parainfluenza Virus 2
103	Mumps Virus / Parotitis virus / Oreillons	1263	Parainfluenza Virus 3
104	Varicella-Zoster Virus (VZV)	127	Mycoplasma pneumoniae
105	Herpes simplex Virus 1/2	128	Adenovirus
1051	Herpes simplex Virus 1	129	Röteln Virus / Rubella virus / virus de rubéole
1052	Herpes simplex Virus 2	130	Diphtherie / Diphtheria
106	Legionella pneumophila 1-7	1311	Coxiella burnetii (Q-Fieber) Phase 1 / Coxiella burnetii (Q-fever) phase 1
107	Echinococcus	1312	Coxiella burnetii (Q-Fieber) Phase 2 / Coxiella burnetii (Q-fever) phase 2
108	Tetanus	132	Aspergillus fumigatus
109	Cytomegalovirus	133	Enterovirus
110	Toxoplasma gondii	134	Coxsackievirus
112	FSME Virus / TBE Virus	135	Echovirus
113	Resp. Syncytial Virus (RSV)	1361	Epstein-Barr Virus VCA
114	Dengue Virus	1362	Epstein-Barr Virus EBNA 1
116	Brucella	1363	Epstein-Barr Virus Early Antigen
117	Candida albicans	137	Chlamydia
118	Helicobacter pylori	1371	Chlamydia pneumoniae
120	Bordetella pertussis	1372	Chlamydia trachomatis
1201	Bordetella pertussis Toxin	138	Yersinia
121	Borrelia burgdorferi	139	Campylobacter jejuni
122	Parvovirus B19	140	Bacillus anthracis
1231	Influenza A Virus	142	Francisella tularensis
1232	Influenza B Virus	143	Tyrosinase
125	Leptospira	144	Thyroglobulin
126	Parainfluenza Virus 1, 2, 3	145	Hantavirus Puumala
1261	Parainfluenza Virus 1		