

RIDASCREEN[®] Helicobacter IgA, IgG

Art. N^o: K2311 (IgA)
K2321 (IgG)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Área de aplicação

Para diagnóstico *in vitro*. Os testes RIDASCREEN® de helicobacter são testes imunoenzimáticos para determinação quantitativa de anticorpos IgA ou IgG contra a bactéria helicobacter pylori no soro humano.

Os testes devem ser realizados no caso de suspeita fundada de uma infecção pela bactéria helicobacter ou para esclarecimento do estado imunológico.

2. Resumo e explicação do teste

Após a infecção com helicobacter, formam-se anticorpos específicos contra o agente patogênico devido à reação do sistema imunológico. Estes anticorpos podem ser determinados no soro por meio de métodos imunológicos. O método de teste utilizado e a escolha do antígeno específico para o agente patogênico são importantes para a força probatória do teste.

3. Princípio do teste

Antígenos purificados estão ligados à microplaca. Os anticorpos existentes no paciente fixam-se aos antígenos e são determinados em um segundo passo da incubação mediante utilização de anticorpos anti-humanos marcados com enzimas (conjugado). As enzimas convertem o substrato incolor (H_2O_2/TMB) em um produto final azul. A reação enzimática é terminada mediante a adição de ácido sulfúrico e a cor desta mistura muda de azul para amarelo. A medição final é feita em um fotômetro a 450 nm com um comprimento de onda de referência ≥ 620 nm.

4. Conteúdo da embalagem

Tab. 1: Conteúdo da embalagem (Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 testes)

			K2311 IgA	K2321 IgG
Placa	96 testes	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no suporte; revestidas com antígeno h. pylori	X	X
SeroPP	110 ml	Tampão de amostra, pronto para uso; solução NaCl tamponada com fosfato, coloração amarela;	X	X
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem, 10x concentrado; solução NaCl tamponada com Tris;	X	X
Control IgA + tampa azul	2,5 ml	Controle padrão IgA, pronto para uso; soro humano diluído, coloração azul;	X	
Control IgG + tampa verde	2,5 ml	Controle padrão IgG, pronto para uso; soro humano diluído, coloração verde;		X
Control IgA - tampa incolor	1,2 ml	Controle negativo IgA, pronto para uso; soro humano diluído;	X	
Control IgG - tampa incolor	1,2 ml	Controle negativo IgG, pronto para uso; soro humano diluído;		X
Control IgA A tampa azul	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgA, pronto para uso; soro humano diluído;	X	
Control IgA B tampa azul	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgA, pronto para uso; soro humano diluído;	X	
Control IgG A tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgG, pronto para uso; soro humano diluído;		X
Control IgG B tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgG, pronto para uso; soro humano diluído;		X
SeroA LD tampa azul	12 ml	Conjugado anti-humano IgA LD (cabra), pronto para uso; anticorpos conjugados com peroxidase em solução proteica estabilizada;	X	
SeroG HD tampa verde	12 ml	Conjugado anti-humano IgG HD (cabra), pronto para uso; anticorpos conjugados com peroxidase em solução proteica estabilizada;		X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto para uso	X	X
Stop	12 ml	Reagente de parada 1 N ácido sulfúrico; pronto para uso	X	X

Detalhes sobre substâncias perigosas de acordo com as obrigações de rotulagem. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

5. Reagentes e seu armazenamento

O kit de teste deve ser armazenado entre 2 – 8 °C e pode ser utilizado até à expiração da data de validade impressa na etiqueta. Quando armazenado a uma temperatura entre 2 – 8 °C, o tampão de lavagem diluído pode ser utilizado quatro semanas; quando armazenado a temperatura ambiente (20 – 25 °C) pode ser utilizado uma semana. Após expiração da data de validade a qualidade não é garantida.

A embalagem de alumínio que contém a microplaca deve ser aberta de forma a não se arrancar o fecho. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem ser guardadas imediatamente na embalagem de alumínio fechada entre 2 – 8 °C.

A contaminação dos reagentes deve ser impedida e o substrato incolor não deve ser exposto à incidência de luz direta.

6. Reagentes adicionais necessários e equipamento acessório

6.1. Reagentes

- água destilada ou desionizada

6.2. Equipamento acessório

- Incubadora a 37 °C
- Tubos de teste
- Misturador Vortex
- Micropipetas para volumes de 10 – 100 µl e 100 – 1000 µl
- Proveta (1000 ml)
- Cronômetro
- Lavadora para microplacas ou pipetas multicanais
- Fotômetro para microplacas (450 nm, filtro de referência ≥ 620 nm)
- Papel filtro (panos de laboratório)
- Recipiente para lixo com uma solução de 0,5 % de hipoclorito de sódio

7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções relativo ao procedimento de ensaio deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com a pele ferida ou membranas mucosas. Ao manusear reagentes ou amostras, use roupas de segurança adequadas (luvas apropriadas, jaleco, óculos de segurança) e lave suas mãos após o término do procedimento de ensaio. Não fume, coma ou beba nas áreas onde estão sendo usadas amostras ou reagentes.

Os soros de controle contidos no kit (controle padrão, controle negativo, controle de qualidade A e controle de qualidade B) foram testados para HIV e HCV-Ak, bem como HbsAg, e considerados negativos. Porém, eles devem, bem como as amostras de pacientes e todos os materiais que entrem em contato com eles, ser considerados como potencialmente infecciosos e manejados de acordo com as respectivas regras de segurança nacionais.

Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

Todos os reagentes e materiais utilizados devem ser descartados corretamente após o uso. Consulte os regulamentos nacionais relevantes para a eliminação.

8. Coleta e armazenamento das amostras

O teste foi desenvolvido para a análise de amostras de soro humano. Depois da coleta, o soro devia ser separado do coágulo sanguíneo o mais rapidamente possível para evitar hemólise. As amostras devem ser armazenadas em lugar frio ou congeladas até serem analisadas. Deve-se evitar necessariamente o congelamento e descongelamento repetidos das amostras bem como a contaminação com micróbios. A utilização de amostras lipêmicas, hemolíticas, ictéricas, turvas ou inativadas por calor podem produzir resultados falsos.

Tab. 2: Armazenamento das amostras

Soro não-diluído		Soro diluído
2 – 8 °C	-20 °C	2 – 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Realização do teste

9.1. Generalidades

Antes de serem utilizados, todos os reagentes e as tiras de microtitulação têm de estar a temperatura ambiente (20 – 25 °C). As tiras de microtitulação não devem ser retiradas da embalagem de alumínio antes de atingirem a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser bem misturados pouco antes de serem utilizados. Após a utilização, o kit deve ser armazenado de novo imediatamente entre 2 – 8 °C.

Só deve ser retirado o volume de reagente necessário para a realização do teste. Excessos de reagente não devem ser vertidos novamente nos frascos devido ao risco de contaminação.

As tiras de microtitulação não devem ser utilizadas mais do que uma vez. Os reagentes e as tiras de microtitulação não devem ser utilizados quando a embalagem estiver danificada ou os frascos apresentarem derrames.

Alguns dos reagentes incluídos no kit não são específicos para o teste. Estes reagentes marcados com Sero (por ex. **SeroPP**) também podem ser utilizados em outros testes RIDASCREEN® Sero ELISA com os reagentes correspondentes.

Os soros de controle são específicos do lote. Não é permitido trocar os soros de controle dos kits com um número de lote diferente.

Os Controles de qualidade A e B RIDASCREEN® Sero ELISA são fornecidos adicionalmente como componentes específicos para o respectivo kit de teste RIDASCREEN® Sero ELISA. Trata-se de controles que podem ser aplicados opcionalmente para segurança adicional da qualidade. Eles contêm soro de controle humano com diferentes concentrações de anticorpos.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte do tampão de lavagem **SeroWP** é misturada com 9 partes de água destilada. Para isso, verte-se 100 ml de concentrado em uma proveta de 1000 ml e adiciona-se água destilada até se atingir os 1000 ml. Os cristais eventualmente existentes no concentrado devem ser dissolvidos previamente mediante aquecimento em banho-maria a 37 °C. O tampão de lavagem diluído pode ser utilizado o máximo de quatro semanas quando armazenado entre 2 – 8 °C e uma semana quando armazenado a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

As amostras de soro a analisar são diluídas com o tampão **SeroPP** 1:50 antes de se iniciar o teste.

por ex. 10 µl de soro + 490 µl de **SeroPP**

Atenção!

O controle negativo e controle padrão, Controlo de qualidade A e Controlo de qualidade B estão prontos para uso e não devem ser diluídos ou absorvidos.

9.4. Primeira incubação

Depois de se encaixar uma quantidade de tiras/poços suficientes no suporte, pipetar 100 µl de soros diluídos e 100 µl de controles prontos para uso nos respectivos poços e deixar a posição A1 (valor em branco do reagente) vazia. Adicionar o controle negativo **Control IgA | -** ou **Control IgG | -** uma vez e o controle padrão **Control IgA | +** ou **Control IgG | +** duplicado. Adicionar o controle de qualidade **Control IgA | A** e **Control IgA | B** ou **Control IgG | A** e **Control IgG | B** uma vez. Cobrir a placa e incubá-la 30 minutos a 37 °C em uma incubadora. Durante este processo, o exterior do fundo dos poços não deve estar em contato com materiais de boa condutibilidade térmica. A microplaca deve estar coberta durante o processo de incubação.

Devem ser utilizados os controles que correspondem à determinação (IgA ou IgG).

A1	Valor em branco do reagente
B1	Controle negativo
C1	Controle padrão
D1	Controle padrão
E1	Controlo de qualidade A
F1	Controlo de qualidade B
G1,H1	Soro do paciente 1, 2 etc.

Atenção!

A microplaca não deve ser colocada em um contêiner de incubação frio que só aquece a 37 °C durante a incubação. O contêiner tem de estar previamente adaptado a 37 °C.

9.5. Lavagem

Os poços devem ser esvaziados em um recipiente de lixo com solução de hipoclorito para desinfecção. Em seguida bate-se na placa sobre papel absorvente para remover o resto da umidade. Depois disso, lava-se a placa 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez. Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das quatro lavagens sobre uma parte do papel ainda não usada.

Utilizando-se uma lavadora de microplacas deve-se verificar se ela está corretamente programada para o tipo de placa em questão. Depois da lavagem, deve-se bater na placa sobre papel absorvente limpo para remoção do resto da umidade.

9.6. Segunda incubação

Adicionar 100 µl de conjugado anti-humano IgA LD **SeroA LD** ou conjugado anti-humano IgG HD **SeroG HD** nos poços correspondentes (inclusivamente A1). Em seguida incubar a placa 30 minutos a 37 °C na incubadora (ver ponto 9.4.).

9.7. Lavagem

Lavar 4 vezes como descrito no ponto 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adicionar 100 µl de substrato **SeroSC** em todos os poços. Em seguida incubar a placa 30 minutos a 37 °C em uma incubadora. Depois disto, adicionar 100 µl de solução de parada **Stop** em todos os poços para terminar a reação. Depois de misturá-la cuidadosamente (batendo-se suavemente na beira da placa), medir a extinção a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm). Calibrar a zero o valor em branco do reagente (posição A1).

10. Controlo de qualidade e sinais de caducidade do reagente

Para fins de controle de qualidade, devem ser sempre utilizados o controle padrão (duplamente) e o controle negativo cada vez que se efetuar um teste. O teste foi realizado corretamente quando a extinção média do controle padrão a 450/620 nm estiver na gama indicada na folha de dados anexa. Se ambas as medições individuais apresentarem desvios à média superiores a 20%, o teste tem de ser repetido. O controle negativo a 450/620 nm tem de apresentar um valor de extinção $< 0,3$.

Os controlos de qualidade A e B RIDASCREEN® Sero ELISA são controlos adicionais que podem ser utilizados opcionalmente para fins de controle da qualidade. As gamas-alvo devem ser consultadas no certificado de garantia de qualidade anexo, específico do lote. Os valores (U/ml, IU/ml ou mIU/ml) obtidos são recomendados aos usuários como valores de referência para a garantia de qualidade do laboratório.

Se os valores divergirem dos requeridos ou se os reagentes estiverem turvos ou o substrato estiver azulado antes de serem adicionados nos poços, pode ser sinal de que os reagentes já caducaram.

Se os valores estipulados não forem atingidos, há que verificar os pontos seguintes antes da repetição do teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (calibração, por exemplo)
- Realização correta do teste
- Controle visual dos componentes do kit quanto a contaminação ou má vedação; uma solução de substrato com coloração azulada já não deve ser utilizada

Se após a repetição do teste as condições continuarem insatisfatórias, contate o fabricante.

11. Avaliação e interpretação

O teste pode ser avaliado mediante três métodos diferentes:

1. Mediante a curva padrão fornecida no kit
2. Mediante a tabela de valores (ver folha de dados anexa)
3. Matematicamente mediante o método de 4 parâmetros ou o método α

O valor em branco do reagente tem de ser subtraído de cada valor de extinção antes da avaliação.

11.1. Avaliação mediante a curva padrão

Para se poder realizar a avaliação mediante a curva padrão há que efetuar primeiro, através da média do controle padrão, uma correção das flutuações que podem ocorrer de um dia para o outro. Do valor teórico do controle padrão e do valor do controle atualmente medido, calcula-se o fator de correção F. O valor teórico dependente do lote está mencionado na folha de dados anexa.

$$F = \frac{\text{Valor teórico do controle padrão}}{\text{Valor médio de absorbância do controle padrão}}$$

Todos os valores OD das amostras são multiplicados pelo fator F. Com estes valores corrigidos, lê-se depois o valor U/ml correspondente na curva padrão.

11.2. Avaliação mediante a tabela de valores

	U/ml	Gama de valores do controle padrão	
			0,89 - 0,94
-	< 10,0		< 0,17
?	10,0 - 16,0		0,17 - 0,26
+	16,1 - 30,0		0,27 - 0,47
	30,1 - 60,0		0,48 - 0,80
	60,1 - 110,0		0,81 - 1,27
	110,1 - 210,0		1,28 - 1,84
	210,1 - 400,0		1,85 - 2,39
	> 400,0		> 2,39

Fig. 1: Exemplo de uma determinação de IgG
(Extrato de uma folha de dados específica de um lote)

O valor de extinção médio do controle padrão é decisivo para identificar na tabela de valores qual é a coluna com a gama de valores válida para a medição atual. Nesta coluna, atribui-se o valor de extinção da amostra medido à gama de extinção correspondente e na segunda coluna da esquerda para a direita lê-se a respectiva titulação em U/ml.

Por exemplo, o valor de extinção médio do controle padrão de uma medição é 0,91. Neste caso, a coluna da tabela com a gama 0,89 a 0,94 é a coluna a utilizar para o apuramento do resultado. Uma amostra de paciente com um valor de extinção 0,61 corresponde a uma gama de titulação entre 30,1 a 60,0 Units/ml. (Os valores citados são exemplificativos e podem divergir dos valores atuais da folha de dados.)

A avaliação do resultado apurado - positivo (+), negativo (-) ou duvidoso (?) - consulta-se na primeira coluna da tabela de valores.

11.3. Avaliação matemática

Os valores necessários para a avaliação matemática pelo método de 4 parâmetros ou pelo método α estão mencionados na folha de dados anexa.

11.4. Resultado do teste

Tab. 3: Avaliação das "units" apuradas

	IgA	IgG
negativo	< 10 U/ml	< 10 U/ml
duvidoso	10 - 13 U/ml	10 - 16 U/ml
positivo	> 13 U/ml	> 16 U/ml

12. Limites do método

Os testes RIDASCREEN® Helicobacter ELISA detectam anticorpos IgA ou IgG contra h. pylori. Dos testes não se pode concluir uma relação entre o valor de extinção medido e a manifestação ou a gravidade de sintomas clínicos. Os resultados obtidos devem ser sempre interpretados em associação com o quadro clínico.

Um resultado negativo no teste ELISA não exclui a infecção com helicobacter pylori. No caso de suspeita clínica de uma infecção com helicobacter pylori e de resultado serológico negativo, deve ser coletada uma nova amostra de soro passado quatro semanas para novo teste.

Um resultado duvidoso pode ser indicação de uma resposta imune. Há presença de anticorpos contra helicobacter pylori. A soroconversão progressiva que indica um desenvolvimento agudo da doença tem de ser esclarecida com um novo teste passado duas a quatro semanas. Um resultado incerto também pode ser observado após terapia e recobro de uma infecção.

Quando de análises serológicas, deviam ser analisadas normalmente sempre duas amostras de soro do paciente consecutivas para aumentar a força de afirmação do diagnóstico. O progresso da titulação é importante para a interpretação do resultado.

Um resultado positivo no teste ELISA não significa que a doença se encontra em desenvolvimento ativo. Os anticorpos também podem ser determinados durante a colonização subclínica com helicobacter pylori. Recomendamos a realização do teste RIDA[®]LINE Helicobacter para confirmação do resultado do teste ELISA e para identificação de cepas de helicobacter pylori altamente virulentas através da determinação de anticorpos contra os fatores de patogenicidade CagA e VacA.

Atualmente, ainda há poucos testes sobre a importância dos anticorpos IgA em uma infecção com helicobacter pylori. No caso de resultados IgG confusos, recomendamos a realização deste teste.

Um resultado positivo não exclui a presença de outros agentes patogênicos infecciosos como causa de uma doença.

13. Características de desempenho

Tab. 4: Variação inter-teste (n=30)

<u>Variação inter-teste</u>	<u>IgA</u>		<u>IgG</u>	
	OD	VK	OD	VK
Soro 1	0,189	8,7 %	0,192	7,1 %
Soro 2	0,388	8,5 %	0,683	9,7 %
Soro 3	0,872	8,3 %	1,166	8,2 %

Tab. 5: Variação inter-teste (n=24)

Variação inter-teste	IgA		IgG	
	OD	VK	OD	VK
Soro 1	0,169	9,4 %	0,170	4,5 %
Soro 2	0,350	9,1 %	0,615	4,8 %
Soro 3	0,832	7,7 %	1,152	4,6 %

Tab. 6: Sensitividade e especificidade em comparação com outros dois testes ELISA comerciais

	IgA	IgG
Sensitividade	100,0 %	100,0 %
Especificidade	94,7 %	100,0 %

Tab. 7: Resultados da análise do soro de 200 doadores de sangue de um banco de sangue na Alemanha

200 soros de doadores de sangue	IgA	IgG
negativo	66,5 %	77,5 %
duvidoso	10,5 %	4,5 %
positivo	23,0 %	18,0 %

Literatura

1. Marshall, B.F., Royce, H., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Taylor, N.S., Edmonds, P., Sly, L.I., Brenner, D.J.: Original Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letter* 25, 83 (1982)
2. Warren, J.R.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* I, 1273 - 1275 (1983)
3. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vanderstetten, D.P., Chang, Y., Vogelmann, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325, 1127 - 1131 (1991)
4. Stolte M., Eidt, S.: Healing gastric MALT lymphomas by eradicating *H. pylori*. *Lancet* 342, 568 (1993)
5. Stolte, M.: *Helicobacter pylori* and gastric MALT lymphoma. *Lancet* 339, 745 - 746 (1992)
6. Hentschel, E., Brandstatter, G., Dragosics, B., Hirschl, A.M., Nemec, H., Schutze, K., Taufer, M., Wurzer, H.: Effect of Ranitidine and Amoxicillin plus Metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 328, 308 - 312 (1993)
7. Stadelmann, O.: *Helicobacter pylori*: Indikationen und Praxis der Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 92, 39 - 41 (1995)
8. Telford, J.L., Ghiara, P., Dellorco, M., Comanducci, M., Burrioni, D., Bugnoli, M., Tecce, M.F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z.Y., Papini, E., Montecucco, C., Parente, L., Rappuoli, R.: Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* 179, 1653 -1658 (1994)
9. Lee, A.: *H. pylori* initiated ulcerogenesis: look to the host. *Lancet* 341, 281 (1993)
10. Schmitt, W., Haas, R.: Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin - structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 12, 307 - 319 (1994)
11. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrioni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., Rappuoli, R.: Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5791 - 5795 (1993)
12. Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P.F., Telford, J.L., Figura, N., Rappuoli, R.: 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 (1995)
13. Krakowka, S., Morgan, D.R., Kraft, W.G., Leunk, R.D.: Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect. Immun.* 55, 2789 - 2796 (1987)

14. Karita, M., Li, Q., Cantero, D., Okita, K.: Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germ-free mice. *Am. J. Gastroenterol.* 89, 208 - 213 (1994)
15. Marchetti, M., Arico, B., Burrioni, D., Figura, N., Rappuoli, R., Ghiara, P.: Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267, 1655 - 1658 (1995)