

USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, su supporto immunocromatografico, per la determinazione qualitativa di antigeni specifici di *Helicobacter pylori* (H.p.) in campioni di feci umane

PRINCIPIO DEL METODO

Nella formulazione di *Helicobacter Pylori Ag (Antigene)* viene utilizzata una metodologia analitica rapida e qualitativa, in grado di determinare la presenza di antigeni presenti spessi dal batterio *Helicobacter pylori* (H.p.), in campioni di feci umane. Il supporto reattivo ("card") è pronto all'uso ed è in grado di rilevare, in modo specifico e sensibile, la presenza tali antigeni batterici nel campione fecale, utilizzando una tecnologia immunocromatografica su membrana (immunodosaggio con flusso laterale del campione). Sulla membrana, in corrispondenza della regione contenente la linea test (T, zona di reazione positiva), sono presenti anticorpi monoclonali anti-*Helicobacter pylori*. Durante l'esecuzione del test, il campione, opportunamente diluito, migra cromatograficamente lungo la membrana per azione capillare per reagire con anticorpi monoclonali anti-*Helicobacter pylori* adesi a microparticelle presenti nella membrana generando, qualora presenti antigeni di *Helicobacter pylori*, una linea colorata. La presenza di tale linea colorata nella regione T indica un risultato POSITIVO, mentre l'assenza ne indica uno NEGATIVO.

Il contemporaneo sviluppo di un'ulteriore linea colorata nella regione contrassegnata con C (Controllo), viene impiegato come controllo procedurale: la sua presenza indica che è stata inoculata una corretta quantità di campione e che la migrazione è avvenuta in modo appropriato.

CONTENUTO DEL KIT

- Card reattivo monouso in sacchetto sigillato individuale: ciascuna contiene anticorpi monoclonali anti-*Helicobacter pylori* adesi a microparticelle e membrana sensibilizzata con anticorpi monoclonali anti-*Helicobacter pylori*.
- Fiaconcini monouso per il prelievo del campione: bacchette di raccolta campione (applicatore del campione) e relativi supporti in tampone di estrazione
- Istruzioni per l'uso

PRECAUZIONI

Mantenere tutti i reagenti a temperatura di 2°-30°C. NON CONGELARE.
Per uso diagnostico esclusivo *in vitro*. Non utilizzare dopo la data di scadenza.
Conservare ciascuna card non utilizzata nel proprio involucro sigillato.
Non mangiare, bere o fumare durante la manipolazione dei campioni e l'esecuzione del test.
I campioni devono essere considerati **potenzialmente infetti**. Osservare le precauzioni idonee alla manipolazione di agenti infettanti; seguire la B.P.L.
Smaltire il materiale utilizzato secondo la normativa vigente.
Indossare guanti, camice e dispositivi di protezione oculare.
L'eccessiva umidità e la temperatura elevata dell'ambiente possono inficiare i risultati.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Tutti i reagenti sono pronti all'uso

MATERIALE AGGIUNTIVO

Timer, contenitori specifici per raccolta campioni fecali, micropipette e puntali monouso (opzionali), pipette contagocce, centrifuga

CAMPIONI

Feci raccolte in contenitore specifico acquistabile in farmacia.



Tutti i campioni biologici impiegati devono essere considerati **POTENZIALMENTE INFETTI** e, come tali, manipolati secondo la B.P.L.

PROCEDURA OPERATIVA

Portare i reagenti ed i campioni a T.A. (15-30°C) prima del test

Raccogliere il campione nel contenitore specifico acquistabile in farmacia. Risultati ottimali si ottengono se il test viene eseguito entro 6 ore dalla raccolta del campione. I campioni possono essere conservati, prima del test, fino a 3 giorni se refrigerati a 2-8°C. Per periodi di conservazione prolungati è possibile congelare i campioni.

Metodologia di analisi delle diverse tipologie di campioni

- Per campioni di feci solide**
 - Svitare il tappo del fiaconcino di prelievo, evitando la fuoriuscita del liquido
 - Immergere la bacchetta di raccolta (applicatore) collegata al tappo in 3-4 punti diversi della massa fecale, evitando di spalmare il campione, per permettere una raccolta di circa 50 mg di feci (equivalenti a alla quantità di un pisello)
- Per campioni di feci liquide**
 - Svitare il tappo del fiaconcino di prelievo, evitando la fuoriuscita del liquido
 - Utilizzare una pipetta contagocce ed aspirare il campione fecale: trasferire 2 gocce (circa 80 µl) nel fiaconcino di prelievo contenente il tampone di estrazione.

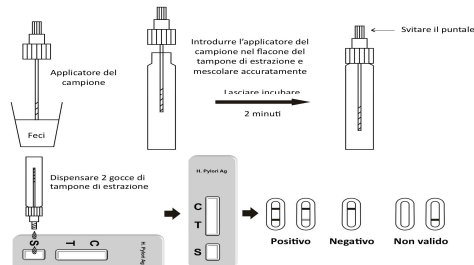
Procedura comune

- Reinserire l'applicatore nel fiaconcino, riavvitando il tappo
- Scuotere con decisione il fiaconcino di prelievo per permettere l'estrazione da parte del tampone di estrazione: lasciare incubare nel fiaconcino per 2 minuti.
- Identificare il campione
- Il test deve essere eseguito entro 1 h. dall'estrazione del campione.
- I campioni estratti possono essere conservati fino a 6 mesi se congelati a -20°C.

ESECUZIONE DEL TEST

- Ripartire a T.A. i reagenti, qualora fossero stati mantenuti in frigorifero.
- Dopo aver preparato il campione di feci nei relativi fiaconcini con tampone, estrarre la card dal sacchetto sigillato e porla sul piano pulito. I risultati migliori si ottengono qualora la card venga utilizzata subito dopo averla estratta dal sacchetto sigillato.
- Mantenendo il fiaconcino in posizione verticale (vedi figura sotto) ruotare e sollevare il tappo sulla punta del fiaconcino di prelievo e trasferire 2 gocce del campione estratto (circa 80 µl) nel pozzetto del campione (contrassegnato con S sulla card): far partire il timer. Evitare la formazione di bolle d'aria nel pozzetto S.
- Attendere lo sviluppo delle linee colorate. I risultati vanno letti dopo 10 minuti: non interpretare i risultati dopo 20 minuti

Nota: qualora il campione estratto non migri correttamente lungo la membrana immunocromatografica (ad esempio a causa di materiale solido particolato), centrifugare il campione estratto contenuto nel fiaconcino con tampone. Dispensare, utilizzando una micropipetta, 80 µl di sovrantante limpido nel pozzetto S di una nuova card e seguire le istruzioni cui sopra (punti 3 e 4)



INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Facendo riferimento alla figura, si potranno ottenere tre tipi di risultati:

POSITIVO: in aggiunta alla linea del controllo (C), si evidenzia in modo netto una linea colorata nella zona di reazione positiva (T). L'intensità della colorazione in questa zona dipende dalla concentrazione di emoglobina nel campione; comunque, anche la formazione di una debole linea colorata è indicativo di positività del test.

NEGATIVO: si sviluppa la linea colorata soltanto nella zona di controllo (C); non appare la linea nella zona di reazione positiva

INDETERMINATO (RIPETERE): se non si evidenziano distinte linee colorate, sia nella zona del controllo che nella zona di reazione positiva, il test è da considerarsi "non valido": si raccomanda di ripetere il test.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il controllo procedurale è già presente sulla card (regione C)

Materiale specifico per Controllo di Qualità Interno non viene fornito a corredo del kit; comunque si raccomanda di eseguire il test utilizzando un controllo negativo e uno positivo secondo la B.P.L., per verificare le caratteristiche analitiche del metodo e la sua corretta esecuzione

PRESTAZIONI DEL METODO

Il presente metodo è stato comparato con metodiche endoscopiche: l'accuratezza complessiva è risultata del 98,9%

Sensibilità e Specificità

Questi parametri sono stati valutati utilizzando campioni provenienti da individui sia sintomatici che asintomatici: i risultati ottenuti hanno dimostrato una sensibilità relativa >99,9% e una specificità relativa del 98,1% quando il presente metodo è stato correlato con metodologie endoscopiche

Metodo	Metodologie endoscopiche		Risultati totali
	Risultati	Positivi	Negativi
Helicobacter Pylori Ag (antigene)	Positivi	78	2
	Negativi	0	101
	Risultati totali	78	103

Sensibilità relativa: 78/78=>99,9% (95%CI*: 96,2%-100,0%);

Specificità relativa: 101/103=98,1% (95%CI*: 93,2%-99,8%);

Accuratezza: (78+101)/(78+103)=98,9% (95%CI*: 96,1%-99,9%).

*Intervallo di confidenza

PRECISIONE

Intrasaggio

La precisione intrasaggio è stata determinata impiegando 15 replicati di quattro campioni: un negativo, un positivo a basso titolo, un positivo a medio titolo e un positivo ad alto titolo di antigeni da H.p.. I campioni sono stati correttamente identificati in più del 99% dei casi.

Intersaggio

La precisione intersaggio è stata determinata attraverso 15 saggi indipendenti dei medesimi 4 campioni: un negativo, un positivo a basso titolo, un positivo a medio titolo e un positivo ad alto titolo di antigeni da H.p.. Sono stati testati 3 differenti lotti di *Helicobacter Pylori Ag* (antigene) per analizzare tali campioni. I campioni sono stati correttamente identificati in più del 99% dei casi.

CROSS-REATTIVITÀ

La cross-reattività verso i sottoelencati microorganismi è stata studiata su colture da 1.0×10^9 microorganismi/ml. Tutti questi microorganismi non hanno dimostrato cross-reattività quando analizzati con il presente metodo.

Acinetobacter calcoaceticus	Acinetobacter spp	Branhamella catarrhalis	Candida albicans
Chlamydia trachomatis	Enterococcus faecium	E.coli	Enterococcus
faecalis Gardnerella vaginalis	Streptococcus Gr. A	Streptococcus Gr. B	
Streptococcus Gr. C			
Hemophilus influenzae	Klebsiella pneumoniae	Neisseria gonorrhoeae	Neisseria meningitidis
Proteus mirabilis	Proteus vulgaris	Pseudomonas aeruginosa	Rotavirus
Salmonella choleraesuis	Staphylococcus aureus	Adenovirus	

LIMITAZIONI DEL METODO

- Per uso diagnostico esclusivo *in vitro*
- Questo test fornisce valutazioni esclusivamente qualitative, ed indica soltanto la presenza o meno di antigeni di H.p. nel campione di feci analizzato.
- Qualora il test fornisca un risultato negativo, ma la sintomatologia persista, devono essere eseguite ulteriori indagini, poiché anche un risultato negativo non esclude definitivamente un'infezione da *Helicobacter pylori*.
- Durante le terapie antibiotiche eradicanti la concentrazione di antigeni di H.p. può scendere al di sotto del limite di rilevabilità del test.
- Trattandosi di un'indagine di Laboratorio, la diagnosi definitiva deve essere confermata da altre indagini diagnostiche e valutazioni cliniche.

CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE

H.pylori (H.p.) è un piccolo batterio spiraliforme che colonizza la superficie dello stomaco e del duodeno. Risulta implicato nell'eziologia di diverse patologie gastrointestinali, incluse le ulcere gastriche e duodenali, la dispepsia non ulcerativa e le gastriti acute e croniche^{1,2}. Nei pazienti con sintomatologia gastrointestinale, vengono impiegate, per la diagnosi di infezione da H.p., metodiche sia invasive che non invasive: quelle invasive, di costo elevato, includono la biopsia gastrica e duodenale seguita da test all'ureasi (presuntivo), coltura e/o e colorazioni istologiche³. Un approccio assai comune alla diagnosi di infezione da H.p. è rappresentato dalla ricerca e identificazione di anticorpi specifici anti-H.p. nel siero di pazienti infettati; la maggiore limitazione di questa indagine sierologica è l'incapacità di distinguere un'infezione in corso da una pregressa: infatti gli anticorpi anti-H.p. possono risultare presenti nel sangue del paziente anche dopo l'eradicazione del batterio⁴. Il presente metodo, ovvero la ricerca dell'antigene di H.p. in campioni di feci umane, è considerato altamente significativo per la diagnosi di infezione da H.p. e nel monitoraggio dell'efficacia della terapia farmacologica eradicante. In diversi studi è stato riportato che più del 90% di pazienti con ulcera duodenale e circa l'80% di pazienti con ulcera gastrica sono infettati da H. pylori⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. Marshall, BJ, McGeachie, DB, Rogers, PAR and Glancy, RG. Pyloric Campylobacterinfection and gastroduodenal disease. Med. J. Australia. (1985), 149: 439-44.
2. Soll, AH. Pathogenesis of peptic ulcer and implications for therapy. New England J. Med.(1990), 322: 909-16.
3. Hazell, SL, et al. Campylobacter pyloridis and gastritis I: Detection of urease as a markerof bacterial colonization and gastritis. Amer. J. Gastroenterology. (1987), 82(4): 292-96.
4. Cutler AF. Testing for Helicobacter pylori in clinical practice. Am j. Med. 1996; 100:35S-41S.
5. Anand BS, Raed AK, Malaty HM, et al. Loe point prevalence of peptic ulcer in normalindividual with Helicobacter pylori infection. Am J Gastroenterol. 1996;91:1112-1115.

Indice dei Simboli

	Attenzione, seguire le istruzioni per l'uso		Test per kit		Rappresentante Autorizzato
	Per uso esclusivo "in vitro"		Utilizzare entro		Non riutilizzare
	Conservare a 2-30°C		Numero di Lotto		N. Catalogo #
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata				

Codici di Riordino:
C9302-20 Helicobacter Pylori Ag (antigene)

20 test



Bio Plastic S.r.l - 00100 Roma