

# HePy<sup>®</sup>- Stool II

## Test ELISA monoclonale per la ricerca dell'antigene fecale di *Helicobacter pylori*

### IMPIEGO PREVISTO

**HePy-Stool II** è un test ELISA per la ricerca dell'antigene di *H. pylori* nelle feci. L'impiego di **anticorpi monoclonali** ad alta specificità ed affinità per *H.pylori*, fanno di HePy-Stool II un sistema non invasivo altamente sensibile e specifico per diagnosticare l'infezione da *H.pylori* (1).

### GENERALITA'

L'infezione da *Helicobacter pylori* è la causa più importante dell'ulcera peptica ed è implicata nella maggior parte della malattie gastroduodenali (2). Numerosi studi epidemiologici hanno inoltre dimostrato che l'infezione rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie dello stomaco (3).

La ricerca del batterio nello stomaco ha un duplice scopo: diagnosticare se il paziente ha l'infezione al momento della prima visita e diagnosticare, al termine di una terapia mirata all'eradicazione dell'infezione, se il paziente sia effettivamente guarito.

La ricerca può essere condotta con metodiche invasive (esame istologico, coltura, test rapido all'ureasi) o non invasive (breath test, la ricerca di anticorpi anti *H. pylori* nel siero e la ricerca di antigene nelle feci).

Il breath test è in grado di diagnosticare con elevata efficacia l'infezione e l'avvenuta eradicazione. Gli aspetti negativi sono il costo elevato sia dell'apparecchiatura sia dell'esame e un certo impegno da parte del paziente.

L'aspetto negativo più rilevante della sierologia è la difficoltà di diagnosticare l'avvenuta eradicazione, poiché il titolo anticorpale non decresce rapidamente dopo la guarigione.

La ricerca di materiale antigenico di *H. pylori* nelle feci (4,5) presenta importanti vantaggi: a) l'antigene nelle feci è espressione di un'infezione in atto, di conseguenza il test è particolarmente adatto sia per la diagnosi sia per il monitoraggio della terapia. b) il test comporta un minimo impegno da parte del paziente c) è più economico del breath test.

### PRINCIPIO DEL TEST

I micropozzetti sono sensibilizzati con anticorpo monoclonale. Il campione fecale è dissolto nel tampone di diluizione. La sospensione è aggiunta al pozzetto, l'antigene eventualmente presente viene catturato dall'anticorpo monoclonale della fase solida e contemporaneamente dagli anticorpi monoclonali coniugato con perossidasi. Dopo il lavaggio dei pozzetti gli immunocomplessi formati dal legame con il coniugato sono visualizzati con la soluzione cromogena (TMB), che in caso di positività diventerà di colore blu. La soluzione d'arresto blocca la reazione e modifica il colore da blu a giallo. La colorazione del pozzetto sarà proporzionale alla quantità di enzima rimasto ancorato al pozzetto e quindi alla presenza di antigene fecale.

### CONTENUTO DEL KIT

- **Pozzetti sensibilizzati con anticorpo monoclonale** **MoAb**

6 strisce da 8 micropozzetti (singoli pozzetti estraibili) sensibilizzati con anticorpo monoclonale.

- **Bastoncini di legno**

48 bastoncini di legno per trasferire e stemperare i campioni di feci

- **Pipette Pasteur monouso in plastica**

48 pipette Pasteur per la dispensazione delle sospensioni fecali nei pozzetti.

- **Diluente del Campione** **DILSPEC**

60 mL di Diluente la sospensione del campione fecale. Soluzione contenente proteine bovine, un detergente e sodio azide 7 mM.

- **Controllo Negativo** **CONTROL**

Liofilo contenente soluzione proteina bovine, un detergente e sodio azide 7 mM.

- **Controllo Positivo** **CONTROL +**

Liofilo contenente soluzione proteina di *H. pylori* (ceppo ATCC 1989: 1µg/mL) ottenute da una sospensione batterica inattivata ed omogeneizzata. Contiene sodio azide 7 mM.

- **Foglio in plastica autoadesivo**

1 foglio adesivo per la copertura dei pozzetti durante le incubazioni.

- **Tampone di lavaggio 20X** **WASHBUF 20 X**

60 mL di Soluzione di Lavaggio concentrata 20 volte costituita da tampone TRIS-HCl contenente un detergente e mertiolato di sodio come conservante

- **Coniugato MoAb-HRP** **CONJ**

8 mL di soluzione di colore rosso pronta per l'uso di anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi, diluito in PBS, contenente proteine stabilizzanti e sostanze antimicrobiche.

- **Substrato TMB** **SUBS TMB**

1 flacone da 16 mL soluzione cromogena contenente tetrametilbenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La soluzione è pronta per l'uso

- **Soluzione Bloccante** **STOPSOL**

10 mL di Soluzione Bloccante acida

- **1 supporto per posizionamento strip**

### MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO CON IL KIT

- Vortex
- Pipette per dispensare 50 e 100 µL
- Dispositivo per il lavaggio dei pozzetti (es. spruzzetta)
- Recipiente da 500 mL per la preparazione della Soluzione di Lavaggio.
- Acqua distillata o deionizzata
- Carta assorbente
- Provette per la preparazione dei campioni
- Lettore piastre ELISA con filtro a 450 nm (opzionale se la lettura viene fatta visivamente)

**PRECAUZIONI**

- Evitare il contatto dei reagenti del kit con la pelle o con le mucose. Se dovesse accadere, lavare immediatamente con acqua.
- Non pipettare con la bocca.
- I campioni fecali possono essere conservati a 2-4 °C e testati entro 24 ore.
- I campioni fecali che non saranno dosati entro 24 ore devono essere congelati fra -20°C e -80°C. Evitare ripetuti scongelamenti.
- Assicurarsi che il campione fecale sia ben disciolto nel tampone di diluizione.
- Eliminare i materiali, reagenti e liquidi di lavaggio usati in appositi contenitori per rifiuti.
- Le parti del kit non contengono materiale umano o infetto, tuttavia si raccomanda l'uso di guanti.
- Evitare il contatto con la Soluzione Bloccante, perché contiene acido cloridrico 2N. In caso di contatto lavare abbondantemente con acqua la parte esposta. Il reattivo è classificato X (Irritante) ai sensi della legislazione vigente; consultare la scheda di sicurezza prima dell'uso.
- Controllare che il reagente cromogeno (TMB) sia incolore e non appaia colorato in azzurro o blu. In questo caso il reagente non è più utilizzabile.
- Non esporre alla luce solare il reagente cromogeno (TMB)
- Il kit qui descritto è un diagnostico *in vitro*, destinato ad un ambito professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare i materiali inoculati con materiali patologici dopo l'uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

**NOTA** Effettuare i lavaggi in un modo efficace e preciso (fino all'orlo). Evitare di contaminare i pozzetti fra di loro, per non avere colorazioni aspecifiche e quindi falsi positivi.

**PROCEDURA**

*Tenere il kit a temperatura ambiente durante la sessione di lavoro. Tutte le incubazioni andranno effettuate a temperatura ambiente.*

**1. PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO 1X:**

Versare l'intero contenuto del flacone Tampone di Lavaggio 20 X in un cilindro ben pulito. Portare a 1200 ml con acqua deionizzata o distillata. Mescolare la soluzione. La soluzione di lavaggio così preparata può essere conservata fino a 15 gg a 2-8 °C.

**2. Controllo Negativo:**

Aggiungere il volume di acqua deionizzata o distillata riportato sull'etichetta del flacone alla polvere liofila, attendere che sia sciolto il contenuto del flacone, quindi agitare su vortex. Stabile 30 giorni a 2-8 °C. o 6 mesi a -20°C.

**3. Controllo Positivo conc 1 µg/mLHpAg :**

Aggiungere il volume di acqua deionizzata o distillata riportato sull'etichetta del flacone alla polvere liofila, quindi agitare su vortex. Stabile 30 giorni a 2-8 °C. o 6 mesi a -20°C

**4. Aggiungere ad una provetta 0,5 ml di Tampone di Diluizione del Campione.**

5. Usando uno dei bastoncini, trasferire nella provetta un frammento di materiale fecale (delle dimensioni di circa un pisello (circa 0,1 g) e stemperarlo nel liquido. Agitare con il vortex fino ad ottenere una sospensione omogenea.

(NOTA: i campioni così preparati possono essere conservati a 2-4°C per essere testati anche il giorno dopo)

6. Aprire la busta, togliere dalla piastra il numero di pozzetti richiesto ed assemblarli nel telaio apposito. Usare 1 pozzetto per ogni campione fecale più 1 per il controllo positivo ed 1 per il controllo negativo. Rimettere i pozzetti non usati nella busta e richiuderla.

Usando una pipetta pasteur fornita nel kit, dispensare nei pozzetti 2 gocce (**100 µL**) di ogni sospensione fecale. In altri due pozzetti dispensare 100 µL di Controllo Positivo e 100 µL di Controllo Negativo, aggiungere a tutti pozzetti 100 µL di Coniugato MoAb-HRP. Agitare manualmente la piastra per 15-20 secondi con leggeri movimenti sul piano orizzontale per facilitare la miscelazione delle due soluzioni. Coprire i pozzetti con il foglio adesivo fornito nel kit (ritagliarne un frammento di dimensioni adeguate). Attendere per **90±10 min**.

7. Svuotare per scuotimento i pozzetti e lavare **5 volte** con il Tampone di Lavaggio.

Si raccomanda che i lavaggi siano fatti fino all'orlo dei pozzetti, per evitare di lasciare tracce di materiale che potrebbero dare origine a false positività. Svuotare i pozzetti e scollarli sbattendoli 2-3 volte su un tavolo ricoperto di un foglio di carta assorbente. **La fase di lavaggio è critica!** Un lavaggio insufficiente può causare falsi positivi per una non completa rimozione del coniugato enzimatico.

8. Aggiungere a tutti i pozzetti 200 µL di soluzione cromogena Substrato TMB ed incubare al riparo della luce per 15 min.

9. Bloccare la reazione aggiungendo 100 µL di Soluzione Bloccante.

**10. Dispensare in un pozzetto nuovo 100 µL di soluzione Substrato TMB e 100 µL di Soluzione Bloccante (Bianco Reattivo)**

11. Leggere le densità ottiche dei controlli e campioni, con un lettore di micropiastre ELISA, dopo aver azzerato con Bianco Reattivo.

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

a) **Il Controllo Positivo** dovrà essere di un colore giallo intenso.

Se letto con un lettore di micropiastre, la OD450 o la OD450/620 dovrà essere >1.000

b) **Il Controllo Negativo** dovrà essere incolore.

Se letto con un lettore di micropiastre, la OD450 dovrà essere < 0.160, mentre la OD450/620 dovrà essere < 0.130.

**Nel caso non si ottenessero questi risultati, il test non è valido e deve essere ripetuto.**

**1. Lettura ad occhio nudo**

**Campione negativo** = Pozzetti incolori (simili al controllo negativo)

**Campione positivo** = Pozzetti con colore giallo evidente.

**2 Lettura spettrofotometrica a 450 nm**

**Campione negativo** = OD450 ≤ 0.130

**Campione positivo** = OD450 > 0.180

**Valori compresi tra 0.130 ≤ OD450 ≤ 0.180** sono da considerarsi **dubbi**, pertanto si consiglia di testarli nuovamente a conferma del dato

**3. Lettura spettrofotometrica a 450/620 nm**

**Campione negativo** = OD450/620 ≤ 0.100

**Campione positivo** = OD450/620 > 0.15

Valori compresi tra  $0.100 \leq OD_{450/620} \leq 150$  sono da considerarsi **dubbi**, pertanto si consiglia di testarli nuovamente a conferma del dato

**PERFORMANCE**

HePy Stool II è stato valutato su 55 pazienti sottoposti a gastroscopia e valutati per la presenza di infezione da *Helicobacter pylori* con l'esame istologico, il test dell'ureasi, l'Urea Breath Test e la sierologia (1). L'infezione era considerata presente quando almeno 3 dei 4 test risultavano positivi. Parallelamente sulle feci di questi pazienti è stata effettuata la ricerca dell'antigene di *H.pylori* con HePy Stool II. Sulla base dei criteri citati HePy Stool II ha mostrato una sensibilità nella determinazione dell'antigene del 96% ed una specificità del 98%.

Precisione: I valori di CV risultano del 4-8%.

**CONSERVAZIONE**

Conservare a 2-8°C. Conservare le piastre nella confezione originale, tenuta chiusa. In queste condizioni il kit è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento dei reattivi.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1- Dore M.P., Wengler G., Tadeu V., Marras L., Maragkoudakis E., Osato D.Y., Graham G., Realdi D. A novel monoclonal antibody test to detect *H.pylori* antigens in human stool. The 15th International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter*, Athens, Greece, 11-14 September 2002.
- 2- Suerbaum S., Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med. 2002;347:1175-86.
- 3- Sipponen P. Gastric cancer: pathogenesis, risks, and prevention. J Gastroenterol. 2002;37 Suppl 13:39-44.
- 4- Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F et al.. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. Lancet. 1999;354:30-3.
- 5- Gisbert JP, Pajares JM. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen determination: a systematic review. Am J Gastroenterol. 2001;96:2829-38.

**CONFEZIONE**

REF 393140

HEPY – STOOL II

48 TEST

**Spiegazione della simbologia internazionale usata sul kit**

REF Numero di catalogo



Utilizzare entro

IVD Diagnostico in vitro



Contenuto sufficiente per "n" saggi

LOT Codice del lotto



Limiti di temperature (di conservazione)

CE Simbolo CE



Consultare le istruzioni per l'uso



Conservare lontano dalla luce e da fonti di calore



Fragile maneggiare con cura

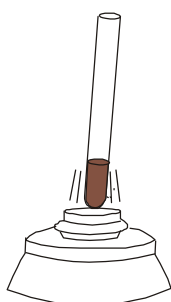
# HePy – Stool II

Test ELISA per la ricerca dell'antigene fecale di *Helicobacter pylori*

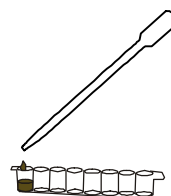
## SCHEMA DI LAVORO



Dissolvere un campione di feci (dim. di un pisello) in 0,5 ml di Tampone di Diluizione Campioni



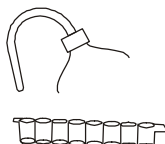
Agitare con vortex (15-20 sec) fino ad ottenere una sospensione omogenea.



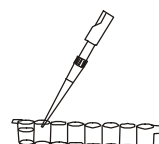
Aggiungere due gocce (100 µl) di ogni sospensione fecale o 100 µl Controllo Positivo o 100 µl di Controllo Negativo. CONTROL + e CONTROL -



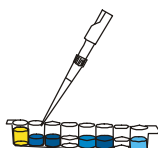
Aggiungere a tutti i pozzetti 100 µl di Coniugato MoAb-HRP. CONJ  
Incubare per 90 minuti



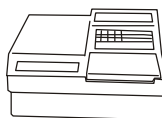
Lavare con Tampone di Lavaggio 5 volte fino all'orlo. WASHBUF



Aggiungere a tutti i pozzetti 200 µl di soluzione cromogena (Substrato TMB) ed incubare per 15 minuti. SUBS TMB



Aggiungere 100 µl di Soluzione Bloccante a tutti i pozzetti. STOPSOL



Valutazione del risultato con lettore di piastre (450 nm) oppure ad occhio nudo.

