

VIROTECH Helicobacter pylori IgG LINE Immunoblot

(H. pylori IgG LINE-32)

Objednací l'íslo : WE243G32

(H. pylori IgG LINE-96)

Objednací l'íslo : WE243G96

VIROTECH Helicobacter pylori IgA LINE Immunoblot

(H. pylori IgA LINE-32)

Objednací l'íslo : WE243A32

(H. pylori IgA LINE-96)

Objednací l'íslo : WE243A96

POUZE K DIAGNOSTICE IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH

Löwenplatz 5

D- 65428 Rüsselsheim

tel. : +49-6142-6909-0

fax : +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 31.10.2018

REV 10 / VIROTECH H. pylori IgG & IgA LINE Immunoblot CZ

Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu.....	3
3. Obsah balení.....	3
3.1 Souprava pro 32 analýz	3
3.2 Souprava pro 96 analýz	3
4. Přečítávání a použitelnost testovacích souprav a reagensů	3
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není dodáván součástí).....	4
7. Vyžadovaný materiál.....	4
8. Provedení testu.....	5
8.1 Příprava vzorků	5
8.2 Příprava reagensů	5
8.3 Provedení testu Immunoblot	5
8.4 Použití analyzátoru Immunoblot.....	6
9. Vyhodnocení testu.....	6
9.1 Použití hraniční kontroly Cut off	6
9.2 Kritéria vyhodnocení.....	7
9.3 Hranice testu.....	7
10. Literatura.....	7
11. Schéma provedení testu.....	9

1. Účel použití

Testovací souprava LINE ke kvalitativnímu prokázání specifických protilátek *Helicobacter pylori* IgG popř. IgA v lidském séru.

2. Princip testu

Bílkoviny patogenu (antigeny) jsou speciální technikou přeneseny ve formě proužků na nitrocelulózovou membránu. Nitrocelulózová membrána je potom rozstřána na jednotlivé pásy.

Inkubace nitrocelulózových proužků nesoucích antigen se vzorky lidského séra/plazmy umožňuje prokázat stávající specifické protilátky. Po odstranění nenavázaných protilátek promytím jsou jednotlivé nitrocelulózové pásy inkubovány s alkalickou fosfatázou konjugovanou s koží protilátkou proti lidským IgG popř. IgA. Po odstranění nenavázaného konjugátu promytím zviditelní se vytvořené imunokomplexy antigen-protilátka reakcí se substrátem, který působením enzymu vytváří modrofialové zbarvení proužků v místě lokalizace imunokomplexu. Reakce enzym-substrát se zastaví promytím nitrocelulózových pásek destilovanou vodou / deionizovanou vodou. Podle vytvořeného spektra proužků na membráně odpovídajících jednotlivým antigenům lze usuzovat na přítomnost specifických protilátek tědy IgG popř. IgA proti těmto antigenům.

3. Obsah balení

3.1 Souprava pro 32 analýz

- | | | |
|--|----|----------|
| 1. Nitrocelulózové testovací pásy IgG popř. IgA s antigeny, zesílené fólií, setřené v seřitku, připravené k použití | 1x | 32 pásek |
| 2. Kontrola hraniční (cutoff) IgG popř. IgA, lidské sérum, předem zředěný | 1x | 1,0 ml |
| 3. Ředící roztok/promývací pufr, pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris | 2x | 50 ml |
| 4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s koží protilátkou proti lidským IgG nebo IgA (100 x konc.) s konzervačním prostředkem | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití | 1x | 57 ml |
| 6. Protokol k záznamům a archivování výsledků | 1x | 1 kus |

3.2 Souprava pro 96 analýz

- | | | |
|--|----|----------|
| 1. Nitrocelulózové testovací pásy IgG popř. IgA s antigeny, zesílené fólií, setřené v seřitku, připravené k použití | 3x | 32 pásek |
| 2. Kontrola hraniční (cutoff) IgG popř. IgA, lidské sérum, předem zředěný | 2x | 1,0 ml |
| 3. Ředící roztok/promývací pufr, pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris | 4x | 50 ml |
| 4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s koží protilátkou proti lidským IgG nebo IgA (100 x konc.) s konzervačním prostředkem | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití | 3x | 57 ml |
| 6. Protokol k záznamům a archivování výsledků | 3x | 1 kus |

K dodání na vyžádání:

IgG, popř. IgA- pozitivní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Vyhodnocení pozitivní pruhy > pruhy Cut off můžete zjistit z certifikátu, který je součástí dodávky.
(obj.-l. : IgG: WE243P60 , popř. IgA: WE243P40)

IgG/IgA- negativní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Negativní kontrola nezobrazuje žádné pruhy, resp. žádné vyhodnocení relevantní pruhy > pruhy Cut off.
(obj.-l. : IgG/IgA: WE243N20)

4. Přečkovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů

Testovací soupravu přechovávejte při 2 až 8°C. Upotřebitelnost jednotlivých složek je vyznačena na jejich štítcích, upotřebitelnost soupravy (datum expirace- viz příslušný certifikát o kontrole kvality).

1. Jednotlivé reagensie nenechte zmraznout a nevystavujte je vysokým teplotám.

2. Reagencie nepoužívejte po uplynutí jejich data upotřebitelnosti.
3. Neponechávejte reagencie na přímém světle.
4. Roztok substrátu BCIP/ NBT je citlivý na světlo a musí být přechováván ve tmě.
5. **Nitrocelulózové testovací prasky** po vyjmutí ze sáčku ihned použijte. Sáček se zbylými pásky opatrně uzavřete a přechovávejte při teplotě 2 až 8°C. K archivaci výsledků by měly být nitrocelulózové testovací pásky bezpodmínečně chráněny před přímým slunečním světlem, aby se zabránilo jejich vyblednutí.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	nezemřelý	+2 až +8°C	1 týden
testovací proušky	po otevření	+2 až +8°C (skladování v souladu s dodaným sáčkem)	3 měsíce
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zemřelý	+2 až +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
	po zemřelí (připravený k použití)	+2 až +8°C	4 týdny
	po zemřelí (připravený k použití)	nebo pokojová teplota	2 týdny

5. Preventivní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra jsou využívána pouze séra, která byla testována a sledována negativně na protilátky proti HIV1/2 a HCV a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B.. Přesto by měla být kontrolní séra, vzorky, zemřelé vzorky, konjugáty a nitro-celulózové testovací proušky považována za potenciálně infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práci v laboratořích..
2. Při provádění imunoblotu je třeba používat jednorázové rukavice a pinzetu z umělé hmoty.
3. Likvidace použitého materiálu se uskutečňuje podle specifických směrnic platných v konkrétní zemi použití.
4. Inkubační vaničky jsou výrobcem koncipovány pouze pro jedno použití. Vícenásobné použití těchto inkubačních vaniček je na zodpovědnost uživatele. Při event. vícenásobném použití doporučujeme inkubační vaničky po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného, potom vyfilit a důkladně vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou/demineralizovanou vodou.

6. Další potřebný materiál (není dodáván součástí)

1. Inkubační vaničky (v případě potřeby lze objednat pod objednáčím číslem WE300.08)
2. Vertikální stojánek, případně naklápací (ne rotací)
3. Promývací láhev
4. Pipeta nebo ruční promývačka
5. Mikropipety 5 µl - 1500 µl
6. Čistítko mikropipet
7. Zkumavky na vzorky objemu 2 - 20 ml
8. Pinzeta z umělé hmoty
9. Destilovaná voda nebo deionizovaná voda
10. Filtrální papír

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

8. Provedení testu

Pro dosažení správných výsledků se musí přesně dodržovat pracovní předpis firmy VIROTECH Diagnostics.

8.1 Příprava vzorků

1. Na vzorek pacienta je zapotřebí 15 µl séra/ plazmy v IgG a 30 µl séra/ plazmy v IgA.
2. Vzorky krve by měly být odebírány asepticky venepunkcí. Po úplné koagulaci je třeba sérum oddělit (u plazmy odpadá). Pro delší přechovávání musí být séra zmrazena na - 20°C.
3. Séra se nesmí opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.
4. Séra, která byla tepelně inaktivována nebo jsou lipémicky, hemolyticky nebo mikrobiálně kontaminována mohou vést k chybným výsledkům a neměla by být proto používána.
5. Nepoužívejte zakalená séra (zejména po roztání pokud byla zmražená), popř. se zákal odstraní centrifugováním (5 minut při 1000 x g), řídí supernatant odpipetujte a použijte při testu.

8.2 Příprava reagensí

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna řididla LINE a EcoBlot v jednom testovacím cyklu se stejnými řidly inkubace a komponenty různých parametrů z různých řad. Cut off kontroly se provádí podle parametrů a řad.
2. Před zřeznováním koncentrovaných reagensí se musí vytemperovat na teplotu místnosti. Používejte pouze destilovanou vodu / deionizovanou vodu vysoké kvality a pracujte při teplotě místnosti.
3. Zřezné roztoky před použitím dobře promíchejte.
4. **Zřeznovací / promývací pufr**
Ředící roztok/promývací pufr je k dispozici v 10ti násobné koncentraci. Ředící roztok/promývací pufr se ředí v poměru 1:10 destilovanou nebo deionizovanou vodou (10ml/50ml/100ml koncentrátu + 90ml/450ml/900ml A. dest./deioniz.), dobře promíchat.
Koncentrovaný i ředící ředící/promývací pufr může vykazovat žluté zabarvení. Toto žluté zabarvení však nemá žádný vliv na trvanlivost a funkci ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **Konjugát IgG popř. IgA**
Konjugát 1 + 100 naředíte finálně ředícím zřeznovacím / promývacím pufr a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zřeznování konjugátu (bod: A. Schéma přiblížení testu).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití.

8.3 Provedení testu Immunoblot

Pozor : Nitrocelulózové testovací pásky smí být testovány pouze ve schválené (povolené) řadě (viz etiketu na šitku Blot a označení na každém jednotlivém testovacím proužku).

Pro správné provedení a posouzení Helicobacter pylori LINE musí být při každém testu součástí provedena Cut off kontrola odpovídající parametrům a řad.

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom pásku do řadky řidly inkubací vanilky. Pásky se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zřeznovací / promývací pufr** a vložte na řadu ku.. Dbejte, aby nitrocelulózové testovací pásky byly kapalinou pokryty stejným řad. Pásky nesmí během celého provádění testu oschnout.
4. Zesílené nitrocelulózové testovací pásky se během minuty zcela navlhčí a mohou být inkubovány v poloze zadní stranou dolů, přední stranou dolů nebo v poloze na straně.
5. **15µl séra/ plazmy pacienta v IgG a 30µl séra/plazmy pacienta v IgA; popř. pipetujte 100µl kontroly Cut off / pozitivní / negativní kontroly**, pokud možno na horním, označeném konci pásku. Při pipetování a následujícím odsávání dbejte na to, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci mezi vzorky.
6. Ze řadky zcela odsajte kapalinu nebo opatrně řidly. Při odlévání kapaliny zřeznanou nitrocelulózové testovací pásky ulpěte na dně řadky. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.

7. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na tšepal'ce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Před ukončením posledního promytí připravte potřebné množství prvního zředěného konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze flábků (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **zředěného konjugátu** do flábků s pásky a inkubujte **30 minut** na tšepal'ce .
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze flábků.
11. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml naředěného promývacího pufru na tšepal'ce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte . Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze flábků (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do flábků a nechte vyvíjet zbarvení na **tšepal'ce 10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odtitím roztoku substrátu. Dále promyjte pásky bez další inkubace **3 x** vždy 1,5 ml **destilované nebo deionizované vody**.
15. Odlijte destilovanou nebo deionizovanou vodu a nechte pásky oschnout na l'istém filtra'ním papíře. Zabarvení pozadí, které lze pozorovat u vlhkých nitrocelulózových testovacích pásků, se u oschlých pásků zcela ztrácí. Zesílené nitrocelulózové testovací pásky vyžadují v porovnání s obvyklými nitrocelulózovými testovacími pásky trochu více l'asu, než oschnou.
16. Pro vyhodnocení používejte připojený vyhodnocovací protokol. Popis jednotlivých prouhů na protokolu a přímě na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

Schéma provedení testu viz poslední stránku

8.4 Použití analyzátoru Immunoblot

Pro automatické zpracování Blot a LINE jsou schváleny tyto přístroje: Apollo a Profiblot. V zásadě jsou vhodné všechny automaty Blot obvyklé na trhu.

9. Vyhodnocení testu

Je spolehlivému vyhodnocení je každý z pásků LINE vybaven dvěma kontrolami :

1. kontrolou séra

Pouze po inkubaci se sérem pacienta se pod označovací linií objeví pruh inkubace séra.

2. kontrolou konjugátu

Pásek LINE je vybaven kontrolním pásem konjugátu, který se zobrazí po inkubaci s odpovídajícím konjugátem.

Provedení testu je platné, pokud je na vyvolaných nitrocelulózových páscích zřetelně rozeznatelná jak kontrola séra tak i interní kontrola konjugátu.

Polohu kontrolního pásku séra a konjugátu najdete na protokolu..

9.1 Použití hraniční kontroly Cut off

Pásky, jejichž intenzita je slabší než jsou pásky Cut off kontroly Cut off, nebudou zahrnuty do vyhodnocení.

Pásky IgG a IgA Cut off: Cag A

Význam antigenů

Antigen/ označení	Molekulová hmotnost	Význam antigenů	Specifická protilátka v LINE	Vyskytuje se při <i>H. pylori</i>
CagA (gen A související s cytotoxinem)	140 kD	CagA je v hostitelských buňkách proplachován a zničen, mimo jiné v kyselinotvorných buňkách žaludku. Toto podporuje vznik žaludečních vředů a karcinomů žaludku. Charakteristický pro obzvláště virulentní kmeny typu I, není přítomný u méně virulentních kmenů typu II. Vysoce imunní	Vysoce specifický	Typ I

VacA (vakuolizující cytotoxin A)	87 kD	VacA se přenáší do okolního prostředí, způsobuje poškození buněk v žaludku a působí lokálně imunosupresivně (12). Charakteristický pro obzvláště virulentní kmeny typu I, není přítomný u méně virulentních kmenů typu II. Odpověď protilátky ve srovnání s CagA nepravidelná	Vysoce specifický	Typ I
p30	30 kD	Zatím není charakterizující protein.	Vysoce specifický	Typ I a typ II
UreA Podjednotka ureázy A	26 kD	Ureáza A nevykazuje podobnost s ureázami jiných organismů a je tudíž vysoce specifický marker pro infekce <i>Helicobacter pylori</i> .	Vysoce specifický	Typ I a typ II
P25	25 kD	Membránový protein, který zprostředkovává vazbu <i>Helicobacter pylori</i> na epitelální buňky žaludku (13).	Vysoce specifický	Typ I a typ II
p19	19 kD	Zatím blíže necharakterizující membránový protein	Vysoce specifický	Typ I a typ II

9.2 Kritéria vyhodnocení

Interpretace serologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a další laboratorní nálezy, které jsou k dispozici.

Doporučené posouzení IgG, IgA

Vzniklý pruh (vzniklé pruhy) / Pruhy cut off (hraniční)	Interpretace
Žádný nebo pouze jeden pruh: p30, p19	negativní
Pouze jeden pruh: VacA, UreA, p25	náhodné
CagA nebo Výskyt 2 pruhů těchto protilátek: VacA, p30, UreA, p25, p19	pozitivní

9.3 Hranice testu

1. Ve vzácných případech mohou séra pacienta ukazovat inverzní pásy (tmavé pozadí, bílé pásy); tyto nelze vyhodnotit, to znamená, že test Immunoblot nelze v těchto případech vyhodnotit. Sérum by mělo být provedeno pomocí jiných serologických metod.
2. Perzistence protilátek IgA po úspěšném léčení může trvat 6 měsíců až 3 roky. Protilátky IgG perzistují zpravidla několik let.

10. Literatura

1. *Helicobacter pylori* – Von der Grundlage zur Therapie (1996) Herausgeber P. Malfertheiner, Thieme Verlag
2. Homepage, Nationales Referenzzentrum für *Helicobacter pylori*; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg (2010)
3. Zöller et al (1993) Nachweis der *Helicobacter pylori*-Infektion: Rolle der Immunodiagnostik. *Klin. Lab.* 39: 45-54
4. Epidemiologisches Bulletin, 2005, Nr. 24
5. Kist M., Glocker E., Suerbaum S., Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion, Bundesgesundheitsblatt, 2005

6. *Helicobacter-pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit, AWMF-Leitlinien-Register, Nr. 021/001, 2008
7. Figura N., *Helicobacter* exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996;10, Suppl. I : 79-96
8. Xiang Z., et al., 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.* 1995 Jan., 63 (1):94-98
9. Covacci A.S. et al., Molecular characterisation of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *PNAS*, 1993, 90:5791
10. Cover T.L. et al., Serologic detection of infection with cagA + *Helicobacter pylori* strains, *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33 (6), 1496-1500
11. Weel J.F.L., The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin and *Helicobacter pylori*-related diseases, *JID*, 1996, 173: 1171-5
12. Gebert B. et al., The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolating to immunosuppressive activities, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152(1): 205-220
13. Moran Anthony P. et al., In vivo expression of the 25-kDa laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43 (2005) 331-337

11. Schéma provedení testu

Provedení testu

inkubace vzorků	30 minut	5 µl séra/plazmy pacienta v IgG; 30 µl séra/plazmy pacienta v IgA / 100 µl kontrola v každých 1,5 ml zředovacího / promývacího pufru
promývání	3 x 5 minut	1,5 ml zředovacího / promývacího pufru
inkubace s konjugátem	30 minut	1,5 ml p zředěného konjugátu (1 + 100)
promývání	3 x 5 minut 1 x 1 minuta	1,5 ml zředovacího / promývacího pufru destilovanou / deionizovanou vodou
inkubace se substrátem	10 ± 3 minut	1,5 ml roztoku substrátu
zastavení vývoje barvy	3 x bez meziinkubace	1,5 ml destilované / deionizované vody

Tabulka ředění konjugátu : (zaokrouhleno)

počet proužků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zředovací / promývací pufr	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Koncentrovaný konjugát	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
konečný objem	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

počet proužků	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
zředovací / promývací pufr	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Koncentrovaný konjugát	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
konečný objem	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

počet proužků	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
zředovací / promývací pufr	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Koncentrovaný konjugát	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
konečný objem	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

počet proužků	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
zředovací / promývací pufr	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Koncentrovaný konjugát	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
konečný objem	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml