

VIROTECH Helicobacter pylori IgG LINE Immunoblot

(H. pylori IgG LINE-32)

Objednací číslo : WE243G32

(H. pylori IgG LINE-96)

Objednací číslo : WE243G96

VIROTECH Helicobacter pylori IgA LINE Immunoblot

(H. pylori IgA LINE-32)

Objednací číslo : WE243A32

(H. pylori IgA LINE-96)

Objednací číslo : WE243A96

POUZE K DIAGNOSTICE IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



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. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů	3
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není dodáván současně)	4
7. Vyšetřovaný materiál	4
8. Provedení testu	5
8.1 Příprava vzorků	5
8.2 Příprava reagensů	5
8.3 Provedení testu Imunoblot	5
8.4 Použití analyzátoru Imunoblot	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 popřípadě IgA v lidském séru.

2. Princip testu

Bílkoviny patogenu (antigeny) jsou speciální technikou přeneseny ve formě proužků na nitrocelulóзовou membránu. Nitrocelulóзовá membrána je potom rozstříhána na jednotlivé pásky.

Inkubace nitrocelulóзовých proužků nesoucích antigen se vzorky lidského séra/plazmy umožňuje prokázat stávající specifické protilátky. Po odstranění nenavázaných protilátek promytím jsou jednotlivé nitrocelulóзовé pásky inkubovány s alkalickou fosfatázou konjugovanou s kozí protilátkou proti lidským IgG popřípadě 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 nitrocelulóзовých pásek destilovanou vodou / deionizovanou vodou. Podle vytvořeného spektra proužků na membráně, odpovídajících jednotlivým antigenům lze usuzovat na přítomnost specifických protilátek třídy IgG popřípadě IgA proti těmto antigenům.

3. Obsah balení

3.1 Souprava pro 32 analýz

1. Nitrocelulóзовé testovací pásky IgG popř. IgA s antigeny, zesílené fólií, seříděné v sešitku, připravené k použití	1x	32 pásků
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 kozí 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. Nitrocelulóзовé testovací pásky IgG popř. IgA s antigeny, zesílené fólií, seříděné v sešitku, připravené k použití	3x	32 pásků
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 kozí 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.-č.: 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.-č.: IgG/IgA: WE243N20)

4. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů

Testovací soupravu přechováváte 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 prásky** po vyjmutí ze sáčku ihned použijte. Sáček se zbylými pásky opět pevně 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	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
testovací proužky	po otevření	+2 až +8°C (skladování v současně dodaném sáčku)	3 měsíce
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +8°C	4 týdny
	po zředění (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, zředěné vzorky, konjugáty a nitro-celulózové testovací proužky považována za potenciálně infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práce 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 zodpovědnosti uživatele. Při event. vícenásobném použití doporučujeme inkubační vaničky po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného, potom vyčistit a důkladně vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou/demineralizovanou vodou.

6. Další potřebný materiál (není dodáván současně)

1. Inkubační vaničky (v případě potřeby lze objednat pod objednacím číslem WE300.08)
2. Vertikální třepačka, případně s naklápěním (ne rotační!)
3. Promývací láhev
4. Pipeta nebo ruční promývačka
5. Mikropipety 5 µl - 1500 µl
6. Špičky mikropipet
7. Zkumavky na vzorky objemu 2 - 20 ml
8. Pinzeta z umělé hmoty
9. Destilovaná voda nebo deionizovaná voda
10. Filtrační papír

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulancií), 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), popřípadě se zákal odstraní centrifugováním (5 minut při 1000 x g), čirý supernatant odpipetujte a použijte při testu.

8.2 Příprava reagensí

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna činidla LINE a EcoBlot v jednom testovacím cyklu se stejnými časy inkubace a komponenty různých parametrů z různých šarží. Cut off kontroly se provádějí podle parametrů a šarže.
2. Před zředováním koncentrovaných reagensí se musí vytemperovat na teplotu místnosti. Používejte pouze destilovanou vodu / deionizovanou vodu vysoké kvality a pracujte při teplotě místnosti.
3. Zředěné roztoky před použitím dobře promíchejte.
4. **Zředovací / 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 naředěný ředící/promývací pufr může vykazovat žluté zabarvení. Toto žluté zabarvení však nemá žádný vliv na trvanlivost a funkčnost ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **Konjugát IgG popř. IgA**
Konjugát 1 + 100 naředte finálně zředěným zředovacím / promývacím puforem a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zředování konjugátu (bod: „Schéma průběhu testu“).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití.

8.3 Provedení testu Imunoblot

Pozor : Nitrocelulózové testovací pásky smějí být testovány pouze ve schválené (povolené) třídě Ig (viz etiketu na sešitku Blot a označení na každém jednotlivém testovacím proužku).

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

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom pásku do žlábků čisté inkubační vaničky. Pásků se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zředovací / promývací pufr** a vložte na třepačku.. Dbejte, aby nitrocelulózové testovací pásky byly kapalinou pokryty stejnoměrně. Pásky nesmějí 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 žlábků zcela odsajte kapalinu nebo opatrně ji odlijte. Při odlévání kapaliny zůstanou nitrocelulózové testovací pásky ulpělé na dně žlábků. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.

7. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Před ukončením posledního promytí připravte potřebné množství čerstvého zředěného konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **zředěného konjugátu** do žlábků s pásky a inkubujte **30 minut** na třepačce .
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků.
11. **Pásky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte . Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do žlábků a nechte vyvíjet zbarvení na **třepačce 10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odlitím 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 čistém filtračním 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 času, než oschnou.
16. Pro vyhodnocení používejte připojený vyhodnocovací protokol. Popis jednotlivých proužků na protokolu a přímo na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

Schéma provedení testu viz poslední stránku

8.4 Použití analyzátoru Imunoblot

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	Specificita protilátky 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 předává do okolního prostředí, způsobuje poškození buněk v žaludeční sliznici 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 ureáza 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 epiteliální 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 prověřeno pomocí jiných serologických metod.
2. Perzistence protilátek IgA po úspěšném léčení může činit 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 Immundiagnostik. *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 : (zaokrouhleně)

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