

Immunoblot *Helicobacter* IgG

Immunoblot *Helicobacter* IgA



Imunoblot obsahující testovací stripy s extraktem elektroforeticky oddělených antigenů pro stanovení IgG a IgA protilátek proti *Helicobacter pylori* v lidském krevním séru nebo plazmě.

1. Obecné aspekty

Imunoblot *Helicobacter* je kvalitativní *in vitro* test ke stanovení IgG a IgA protilátek proti *Helicobacter pylori* v lidském krevním séru nebo plazmě. Na rozdíl od ELISA nebo zakapávacích testů tento test umožňuje bezpečnou identifikaci a lokalizaci specifických protilátek pomocí elektroforeticky oddělených antigenů. Jednotlivé protilátky mohou poskytnout informace o tendenci infekce *Helicobacter*.

2. *Helicobacter pylori*

První popisy organismů ve tvaru spirály objevených v lidském žaludku sahají až do přelomu 19. a 20. století. Poprvé uspěli v kultivaci bakterií pocházejících od pacientů trpících chronickou aktivní gastritidou Marshall v roce 1982 (1) a Warren v roce 1983 (2). Ti rovněž bakterie poprvé podrobně popsali. Tyto spirálovité bakterie se nacházejí hlavně ve sliznici v antru, a šíří se do korpusu. Prvně byl doporučen název *Campylobacter pyloridis* nebo *Campylobacter pylori*, nakonec však byl vytvořen samostatný rod *Helicobacter* a název se přeměnil na *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori je gramnegativní, spirálovitě-tvarovaná bakterie. Stejně jako všichni zástupci rodu *Helicobacter*, má *Helicobacter pylori* 2 - 6 unipolárních bičíků, které jsou odpovědné za pohyblivost. Bakterie produkuje řadu chemických látek a toxinů, z nichž nejvýznamnější je ureáza. Ureázou *Helicobacter* rozkládá močovinu na amoniak a bikarbonát, které alkalizují okolní prostředí a dále tak chrání bakterii. Pro bezpečnou identifikaci bakterie se využívá právě reakce ureázy.

Stále ještě není známo, jak se *Helicobacter pylori* přenáší. Je pravděpodobné, že k přenosu dochází prostřednictvím orálně-fekální nebo orálně-orální cestou. Existuje přímý vztah mezi bakterií *Helicobacter pylori* a téměř všemi duodenálními a žaludečními vředy a MALT lymfomy. Je také spojena s vyšším rizikem žaludečních adenokarcinomů (3, 4, 5). V poslední době byl *Helicobacter pylori* klasifikován do 1. skupiny karcinogenů podle WHO. Přibližně 50 % světové populace je touto bakterií nakaženo, výskyt v průmyslových státech je podstatně nižší než v rozvojových zemích. Infekce se obvykle vyskytuje v dětství a přetrvává po desetiletí. Asi u 10% infikovaných pacientů se vyvíjí vážné nemoci, jako jsou vředy žaludku, karcinomy, nebo MALT lymfomy (6). Příčinou těchto jevů mohou být rovněž viry, případně jiné faktory (8,9).

Ačkoliv různé izoláty *Helicobacter pylori* vykazují vysokou genetickou rozmanitost, téměř všechny fenotypové charakteristiky jsou podobné. V současné době jsou známy pouze fenotypové rozdíly u VacA (10) a s ním spojeného proteinu CagA (11). Z tohoto důvodu jsou klinické izoláty rozděleny do dvou skupin (12). Je patrné, že pacienti s duodenálními vředy jsou infikováni mnohem častěji VacA a CagA (typ 1 *Helicobacter pylori*). To naznačuje, že infekce typu 1 vede k vážnému průběhu choroby (13, 14). Tyto klinické nálezy jsou podpořeny z pozorování, kdy lyzáty typu 1, avšak nikoli na typu 2 *Helicobacter pylori*, nebo čistý VacA může způsobit střevní léze u myší (8, 15). Význam spočívá v CagA geneticky související regionech PicA a picB, které mají být odpovědné za indukci cytokinů (19).

3. Diagnostika

V zásadě je jasné, kdy má být provedena invazivní a neinvazivní diagnostika. Gastroskopie se doporučuje především pro vyloučení maligního onemocnění. K přímé detekci patogenu se využívá rychlého ureázového testu (např. HUT test), případně se použije histologické barvení podle Whartin-Starry nebo mikrobiologická kultivace. Pouze prostřednictvím kultivace se testuje rezistence, což je důležité zejména u pacientů, kteří nereagují na léčbu (16). Nicméně, ani gastritida, ani infekce *Helicobacter pylori* nemůže být potvrzena nebo vyloučena pouze gastroscopií.

V neinvazivní diagnostice, může být činnost ureázy detekována v dechu po podání značené močoviny pomocí dechové zkoušky. Detekce sérových protilátek se stává stále důležitější. Potlačením *Helicobacter pylori* pomocí kombinované antibiotické léčby (6, 7) se léčí nejen gastritida nebo peptický vřed, ale také nízká-maligní lymfoma žaludeční MALT (17). U peptických vředů bez potlačení *Helicobacter pylori*, dochází k opakování problémů během jednoho roku až u poloviny všech případů (18).

4. Princip testu

Antigeny jsou využity z pozitivního izolátu *Helicobacter pylori* VacA a CagA a jsou separovány na základě jejich molekulové hmotnosti pomocí SDS gelové elektroforézy. Poté jsou antigeny naneseny na nitrocelulóзовou membránu (Western blot). Membrána je následně inkubována s roztokem proteinů blokujících nenavázané protilátky, je promyta a rozstříhána na jednotlivé stripy.

V prvním kroku jsou proužky inkubovány se zředěnými vzorky séra nebo plazmy. Během inkubace se protilátky proti *Helicobacter pylori* přítomné v testovaných vzorcích váží k antigenům na testovacích proužcích. Nenavázané protilátky jsou odstraněny promytím a proužky následně inkubovány s anti-lidskými IgG a IgA protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (HRP). Specificky navázané protilátky jsou vizualizovány peroxidázou katalyzovanou barevnou reakcí. Tmavý band, který se objeví na odpovídajícím místě testovacího stripu, poukazuje na přítomnost antigen-protilátkového komplexu.

Na horním konci testovacího proužku je umístěn kontrolní band, který se musí objevit při každém testu.

5. Obsah soupravy

Souprava obsahuje reagentie v množství potřebném pro 20 vyšetření.

promývací pufr A (10x koncentrovaný): obsahuje fosfátový pufr, NaCl, KCl, detergent, MIT (0.1%) a Oxypyrion (0.2%) jako konzervační látky	100 ml
substrát TMB (tetramethylbenzidin, přímo k použití)	40 ml
mléčný prášek	5 g
inkubační vaničky na 10 stripů	2 ks
kontrolní strip	1 ks
návod k použití	1 ks
vyhodnocovací formulář	1 ks

5.1. Immunoblot *Helicobacter* IgG

Mimo reagentie uvedené v bodu 5 souprava dále obsahuje:

zkumavka s číslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými <i>Helicobacter pylori</i> antigeny	2 ks
Pozitivní kontrola, lidské sérum anti HIV-1/2, anti-HCV a HBs-Ag negativní, MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%), červený vršek	100 µl
Negativní kontrola, lidské sérum anti HIV-1/2, anti-HCV a HBs-Ag negativní, MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%), modrý vršek	100 µl
IgG konjugát: králičí anti-lidské protilátky konjugované s HRP (100x koncentrovaný), obsahuje NaN ₃ (< 0.1%), MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%), zelený vršek	500 µl

5.2. Immunoblot *Helicobacter* IgA

Mimo reagentie uvedené v bodu 5 souprava dále obsahuje:

zkumavka s číslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými <i>Helicobacter pylori</i> antigeny	2 ks
Pozitivní kontrola, lidské sérum anti HIV-1/2, anti-HCV a HBs-Ag negativní, MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%), červený vršek	160 µl
Negativní kontrola, lidské sérum anti HIV-1/2, anti-HCV a HBs-Ag negativní, MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%), modrý vršek	160 µl
IgA konjugát: králičí anti-lidské protilátky konjugované s HRP (100x koncentrovaný), obsahuje NaN ₃ (< 0.1%), MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (<0.1%), bezbarvý vršek	500 µl

6. Další potřebné reagentie a vybavení, které nejsou součástí soupravy

Deionizovaná voda, vakuový extrakční systém s odpadní nádobou a desinfekcí na infekční roztoky, mikropipety, plastové pinzety, třepačka, graduovaný odměrný válec, váhy.

7. Informace o testu a reagentiích

7.1. Bezpečnostní opatření:

- ❖ Kontrolní séra pocházejí od dárců negativních na anti HIV-1/2, anti-HCV a HBs-Ag. Vzhledem k inkubační době infekce je však třeba zacházet s kontrolními vzorky jako s potenciálně infekčními.
- ❖ Pracujte v ochranných rukavicích.
- ❖ Konjugát obsahuje azid sodný, MIT (methyisothiazolone) a Chloracetamide. Vyhněte se kontaktu s kůží a sliznicemi.
- ❖ Všechny reagentie a materiál, který přijde do kontaktu s potenciálně infekčními vzorky, musí být vydesinfikován a autoklávován při 121°C nejméně 1 hodinu.
- ❖ S testovacími proužky zacházejte opatrně pomocí pinzety.

7.2. Zacházení se soupravou

Reagencie skladujte při teplotě 2–8°C, nezmrazujte. Všechny komponenty soupravy nechte před použitím nejméně 30 minut temperovat při laboratorní teplotě (18–25°C). Celá procedura je prováděna při laboratorní teplotě.

Identické reagencie (dle tištěných symbolů) mohou být použity u různých imunoblotů odpovídající šarže. Dodržujte prosím dobu expirace jednotlivých komponent soupravy.

Všechna kontrolní séra mají šarži vyznačenou na obalu soupravy. Nesmí být použity jiné šarže, než jsou uvedeny.

Před samotnou analýzou testovaná séra a konjugát dobře protřepejte.

Zkumavky obsahující testovací proužky otvírejte teprve těsně před použitím, aby v nich nedocházelo ke kondenzaci vlhkosti. Nepoužité proužky nechejte ve zkumavce a dále skladujte při 2–8°C (zkumavku uzavírejte velmi pevně, proužky nesmí zvlhnout!).

Proužky jsou vzestupně očíslovány a označeny zkratkou daného testu.

Pozitivní a negativní kontroly musí být vždy testovány paralelně bez ohledu na množství testovaných vzorků. To umožní přesnou interpretaci výsledků.

Kvalitu soupravy lze zaručit pouze během doby expirace uvedené na obalu soupravy.

Chraňte veškeré reagencie před přímým slunečním světlem.

Test musí být proveden pouze zaškolenými a kvalifikovanými pracovníky.

Test je vhodný i pro zpracování na automatu. Bližší informace žádejte u svého dodavatele.

7.3. Příprava roztoků

7.3.1. Příprava pracovního ředění promývacího pufru A

Pufr je používán nejen k promývání, ale i k ředění vzorků séra a konjugátu. Podle počtu testovaných proužků připravte odpovídající objem promývacího pufru A (viz tabulka 8). Nejprve rozpusťte mléčný prášek v koncentrátu promývacího pufru A a pak ke směsi přilijte deionizovanou vodu (ředění 1+9). Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebný objem promývacího pufru dopočítat.

Pracovní ředění promývacího pufru A může být při 2–8°C skladováno 4 týdny. Pracovní ředění promývacího pufru A je mírně zakalené a bez zápachu.

Tab. 8: Příprava promývacího pufru A

Použité proužky	Mléčný prášek	Koncentrovaný promývací pufr A	Deionizovaná voda	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	0.1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0.2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0.3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0.5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1.5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2.5 g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1 000 ml

7.3.2. Příprava roztoku konjugátu

Roztok konjugátu musí být připraven těsně před použitím. Pracovní ředění roztoku konjugátu není možné dále skladovat. 1 díl koncentrovaného IgG i IgA konjugátu se ředí se 100 díly pracovního ředění promývacího pufru A (1+100).

Potřebná množství jednotlivých roztoků udává tabulka 9. Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebné objemy daných roztoků dopočítat.

Tab. 9: Objemy pro ředění anti-lidského IgG a IgA konjugátu

Použité proužky *	Koncentrovaný IgG nebo IgA konjugát	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

* Objemy jsou počítány bez „mrtvého objemu“. Připravujte proto roztok konjugátu pro 1-3 proužky navíc v závislosti na způsobu zpracovávání testu (ručně nebo na automatu).

7.3.3. Roztok substrátu

Roztok substrátu je připraven k přímému použití. Před použitím jej vytemperujte na laboratorní teplotu (18-25°C).

Je nutné vyvarovat se kontaminaci roztoku substrátu, např. použitím kontaminované špičky, neboť by se tak ovlivnila citlivost testu.

7.4. Skladování a stabilita

Reagencie skladujte při 2-8°C.

Pracovní ředění promývacího pufru A může být při 2-8°C skladováno 4 týdny.

Roztok konjugátu musí být připraven vždy čerstvý.

8. Vzorky

Jako vzorek lze použít krevní sérum nebo plazmu, které byly co nejdříve po odebrání separovány od koagula. Teplem inaktivované vzorky mohou způsobovat větší ztmavnutí pozadí testu. Za všech okolností předcházejte mikrobiální kontaminaci vzorků. Nerozpustné částice je nutné ze vzorků odstranit ještě před jejich inkubací pomocí centrifugace.

Lipemická, hemolytická nebo zakalená séra způsobují ztmavnutí pozadí testu *Immunoblot Helicobacter* IgG/IgA. Mohou rovněž poskytovat falešné výsledky, proto nesmí být používány.

Upozornění!

Nemůžete-li test provést okamžitě, mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8°C až 2 týdny. Dlouhodoběji je lze skladovat při minimální teplotě -20°C. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků není doporučováno, neboť se tím ovlivňuje kvalita výsledků.

9. Pracovní postup

9.1. Obecné informace

Reprodukovatelnost výsledků závisí především na preciznosti promývání proužků (postup promytí uveden níže).

9.2. Inkubace vzorku

1. 1 inkubační žlábek je určen pro 1 testované sérum. Do každého žlábků napipetujte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A. Plastovou pinzetou opatrně ponořte testovací proužek do příslušného žlábků naplněného promývacím pufrem. Číslo proužku musí směřovat vzhůru.

Upozornění! Testovací proužek musí být do promývacího pufru zcela ponořen.

Do vyhodnocovací tabulky zaznamenejte číslo zkumavky s použitými testovacími proužky a číslo každého proužku.

2. Přidání vzorků

IgG test: Do příslušných žlábků napipetujte **20 µl** neředěného vzorku - lidské sérum nebo plazma (**ředění 1 + 100**).

IgA test: Do příslušných žlábků napipetujte **40 µl** neředěného vzorku - lidské sérum nebo plazma (**ředění 1 + 50**).

Dbejte na to, abyste vzorek přidávali u konce proužku ponořeného v promývacím pufre A, a co možná nejdříve opatrně promíchali.

Do vyhodnocovací tabulky zaznamenejte číslo vzorku a třídu imunoglobulinů (IgG, IgA).

Inkubační misku přikryjte víčkem a za jemného třepání při laboratorní teplotě **1 hodinu** inkubujte.

Upozornění! Dbejte na to, aby se roztoky nedostaly do jiných žlábků. Víčko otevírejte a zavírejte opatrně, aby jednotlivé roztoky nevystříkly ven ze žlábků (riziko křížové kontaminace).

9.3. Promytí

- Po uplynutí inkubační doby opatrně odstraňte plastové víčko.
- Zředěné sérum ze žlábků opatrně odsajte.
Upozornění! Odsávejte roztoky ze žlábků vždy čistou špičkou nebo špičky vždy řádně promyjte deionizovanou vodou. Používáte-li promývačku, řiďte se pokyny výrobce.
- Následně do každého žlábků přidejte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A a za jemného třepání **5 minut** inkubujte. Poté pufr odsajte.
- Promytí dle bodu 3 opakujte ještě **tříkrát**.

9.4. Inkubace s konjugátem

Po promytí proužků do každého žlábků přidejte **2 ml** připraveného **roztoku konjugátu** (viz tabulka 9). Za jemného třepání při laboratorní teplotě **45 minut** inkubujte. Během inkubace musí být žlábků zakryty plastovým víčkem.

9.5. Promytí

Roztok konjugátu ze žlábků odsajte a proužky opět promyjte (viz bod 9.3).

9.6. Reakce substrátu

Do každého žlábků přidejte **1.5 ml** roztoku substrátu a za jemného třepání inkubujte při laboratorní teplotě **5-10 minut**.

Důležité!

Sledujte barevnou reakci a ponechte všechny stripy v substrátovém roztoku do doby, kdy budou viditelné bandy odpovídající pozitivní kontrole.

Barevná reakce může být nepřiměřeně silná v případě silně pozitivních sér. Doporučení: Zastavení reakce je u takových stripů předčasné.

9.7. Zastavení reakce

- Po odsátí roztoku substrátu proužky **tříkrát promyjte deionizovanou vodou**.
- Plastovou pinzetou proužky opatrně vyjměte, umístěte je mezi dvě vrstvy absorbčního papíru a nechte 2 hodiny sušit. Suché proužky vlepíte do vyhodnocovací tabulky a odečtené výsledky zapišete do protokolu.
- Proužky by měly být uchovávány na temném místě.

10. Souhrn pracovního postupu

1.	Vytemperujte všechny reagenty na laboratorní teplotu
2.	Vložte proužky do 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A a zkontrolujte, zda jsou v pufru zcela ponořeny
3.	Přidejte 20 µl (IgG), příp. 40 µl (IgA) vzorku
4.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 1 hodinu inkubujte
5.	Na třepače třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A
6.	Přidejte 2 ml odpovídajícího roztoku konjugátu
7.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 45 minut inkubujte
8.	Na třepače třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A
9.	Přidejte 1.5 ml roztoku substrátu a za jemného třepání při laboratorní teplotě inkubujte 5–10 minut
10.	Proužky promyjte nejméně třikrát deionizovanou vodou
11.	Proužky nechte mezi 2 vrstvami absorbčního papíru 2 hodiny sušit a poté odečtěte výsledky

11. Vyhodnocení

11.1. Vyhodnocení intenzity bandů

1. Pozitivní a negativní kontroly musí být zahrnuty v každém probíhající testu, bez ohledu na počet vzorků.
2. Do přiložené vyhodnocovací tabulky zapište datum, šarži, číslo zkumavky a detekovanou podtřídou protilátek.
3. Dále zapište identifikační čísla vzorků.
4. Přilepte jednotlivé proužky na odpovídající pole vyhodnocovací tabulky tak, aby band kontroly reakce byl na vyznačené linii. Proužek poté transparentní lepicí páskou nalevo od této linie zafixujte. Pokud byste proužek přilepili lepidlem nebo lepicí páskou po celé délce, zbarvení jednotlivých bandů by vymizelo.
5. Kontrolní testovací strip s naneseným antigenem slouží k porovnání jednotlivých bandů. Strip je specifický pro danou soupravu a je vyroben ze stejné nitrocelulókové membrány jako stripy v soupravě. Molekulová hmotnost a názvy jednotlivých antigenů u bandů jsou vyznačeny.
6. Výsledek zapište do vyhodnocovací tabulky.

11.2. Kontrola výsledků

Pozitivní a negativní kontrola musí vždy běžet paralelně s testovanými séry. Tímto jsou ověřeny testovací podmínky a bude tak potvrzeno správné umístění bandů jednotlivých antigenů. Umístění jednotlivých antigenů musí souhlasit s přiloženým kontrolním stripem (umístění jednotlivých bandů je pro každou soupravu specifické).

Kontrolní band se používá ke kontrole správného provedení testu. Tento band musí vykazovat odlišné vybarvení.

Testovací proužky inkubovány s kontrolními séry by měly vykazovat následující bandy.

- IgG pozitivní kontrola
Všechny bandy uvedené na kontrolním testovacím proužku by měly být viditelné.
- IgG negativní kontrola
Bandy mohou být viditelné v MW 58 a / nebo MW 62 (MW = molekulární hmotnost).
- IgA pozitivní kontrola
Minimálně tyto bandy by měly být zjištělné: 62 MW, 58 MW a 28 MW.
- IgA negativní kontrola
Jeden band v MW 58 může být viditelný.

11.3. Interpretace testu IgG

Chcete-li hodnotit výsledky testu, je nutné rozlišovat mezi specifickými a křížově reagujícími bandy. Navíc je nutné vzít v úvahu reaktivitu imunodominantních antigenů.

Na základě klinického hodnocení a matematické analýzy, je u Immunoblotu *Helicobacter* využito bodového hodnocení antigenů *Helicobacter*. To umožňuje bezpečné a snadné hodnocení testu (tabulka č. 10). Na základě bodového hodnocení jednotlivých antigenů lze získat celkový součet bodů a tím i celkovou interpretaci testu (viz tabulka 11).

Tabulka 10: Bodové hodnocení antigenů *Helicobacter* v Immunoblotu

Protein/Antigen Molekulární hmotnost (kDa)	Název	Body
120/87	CagA/VacA	5
67	-	2
62	UreB	1
58	HspA, HspB	1
54	FlaA	2
47	-	5
33	-	5
29	UreA	3
28	-	4
25	-	4
19	-	5

Tab. 11: Vyhodnocení testu

Součet bodů	Hodnocení IgG testu
≤ 10	negativní
11 – 12	hraniční
≥ 13	pozitivní

Pro vyhodnocení výsledku jednotlivých pacientů využijte hodnotící list. Podle jednotlivých antigenů vyjádřených bandy na stripu запиšte do tabulky počet bodů. Jednotlivé body poté sečtete a výsledný součet запиšte do sloupce se symbolem sumy. Pozitivní, hraniční nebo negativní hodnocení vzorku, pak může být přímo stanoveno a zapsáno ve sloupci pro vyhodnocení.

Hodnocení negativních výsledků u ImmunoBlotu *Helicobacter* IgG s pozitivními CagA bandy

Cag-A antigen je velmi specifický antigen *Helicobacter pylori*. U Cag-A nebyly dosud zjištěny geny nebo proteiny z jiných druhů rodu *Helicobacter* nebo jiných organismů. To bylo potvrzeno u vnitřních studií. Specifita protilátek Anti-CagA IgG pro ImmunoBlot *Helicobacter* je 98 %.

CagA je také důležitým ukazatelem Cag pathogenity v genomu *Helicobacter pylori*. V rámci různých národních a mezinárodních studií bylo prokázáno, že je CagA významnější u séropozitivních pacientů než u CagA séronegativních pacientů. CagA séropozitivních pacientů ukazují významně vyšší riziko vzniku žaludečních adeno-karcinomů.

V rámci hodnocení ImmunoBlotu *Helicobacter* IgG s klinicky definovanými séry nebyl žádný vzorek pouze CagA reaktivní. V rámci rutinního screeningu byl tento výsledek prokázán.

Podle významu CagA je vhodné posuzovat negativní výsledek (10 bodů) s protilátkami proti CagA jako hraniční.

11.4. Interpretace testu IgA

Chcete-li hodnotit výsledky testu, je nutné rozlišovat mezi specifickými a křížově reagujícími bandy. Navíc je nutné vzít v úvahu, že reaktivita není tak výrazná jako u testů IgG.

Antigeny, které jsou hodnoceny: CagA (120 kDa) / VacA (87 kDa), UreB (62 kDa), HspA a HspB (58 kDa), (28 kDa). (viz Tabulka 12). Na základě výsledku lze získat součtem body, podle kterých lze výsledek vyhodnotit (viz Tabulka 13).

Tabulka 12: Bodové hodnocení antigenů *Helicobacter* v Immunoblotu

Protein/Antigen Molekulární hmotnost (kDa)	Název	Body
120/87	CagA/VacA	5
62	UreB	1
58	HspA, HspB	2
28	-	3

Tabulka 13: Vyhodnocení testu IgA

Součet bodů	Hodnocení IgG testu
≤ 2	negativní
3 – 4	hraniční
≥ 5	pozitivní

Pro vyhodnocení výsledku jednotlivých pacientů využijte hodnotící list. Podle jednotlivých antigenů vyjádřených bandy na stripu запиšte do tabulky počet bodů. Jednotlivé body poté sečtete a výsledný součet запиšte do sloupce se symbolem sumy. Pozitivní, hraniční nebo negativní hodnocení vzorku, pak může být přímo stanoveno a zapsáno ve sloupci pro vyhodnocení.

11.5. Návod na interpretaci výsledků

Negativní výsledek testu Immunoblot *Helicobacter* nemůže vyloučit infekci *Helicobacter pylori*. Pokud je podezření na infekci *Helicobacter pylori*, přestože jsou sérologická vyšetření negativní, je dobré vzorek uschovat a testování zopakovat po 4 týdnech.

Kladný výsledek u IgG a / nebo IgA *Helicobacter* Immunoblot neznamena, že je aktivní, v každém případě je přítomen patologický proces.

Zejména reaktivita protilátek proti antigenům VacA a CagA má velmi vysokou diagnostickou hodnotu. Protilátky proti CagA / VacA se často nacházejí u pacientů infikovaných zvláště virulentními kmeny. Existuje několik studií zabývajících se významem IgA protilátek u infekce *Helicobacter pylori*. Testování IgA protilátek se provádí jako dodatečná informace k testování IgG protilátek.

Sérologické výsledky by měly být vždy vnímány v souvislosti s klinickým obrazem pacienta. Když jsou sérologické výsledky nejasné, může být ke zjištění stávající infekce použit dechový test v kombinaci s histologickými a mikrobiologickými nálezy. V případě pacientů, kteří nereagují na terapii, je vhodné provést kultivační test.

Tmavě zbarvené testovací proužky:

Séra některých pacientů (např. s alergií na mléčné proteiny) mohou vytvářet tmavé zbarvení celého nitrocelulóзовého pásu. Tento efekt je vyvolán mnoha různými faktory v séru každého pacienta. Vyhodnocení proužků je pak obvykle možné pouze s určitou restrikcí. Např. „inverzní bandy“ (bílé bandy na tmavém pozadí) jsou hodnoceny jako negativní. Dané sérum však musí být v každém případě testováno znovu jinými sérologickými metodami.

12. Klinické výsledky

12.1. Hodnocení IgG

Ve studii prováděné Dr. N. Lehnem v Institutu pro lékařské mikrobiologie, imunologie a hygieny na Technické univerzitě v Mnichově, bylo testováno 99 sér pomocí Immunoblotu *Helicobacter* IgG, z toho bylo 59 *H. pylori* pozitivních a 40 *H. pylori* negativních. Výsledky byly velmi dobře ověřeny histologickými a mikrobiologickými nálezy. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 14.

		Histology/ culture		
		neg	pos	
Immunoblot	neg	33	3	36
	pos	7	56	63
		40	59	99
Specificity:		83%		
Sensitivity:		95%		

Tabulka 14: Korelace Immunoblotu *Helicobacter* IgG s histologickými a mikrobiologickými nálezy.

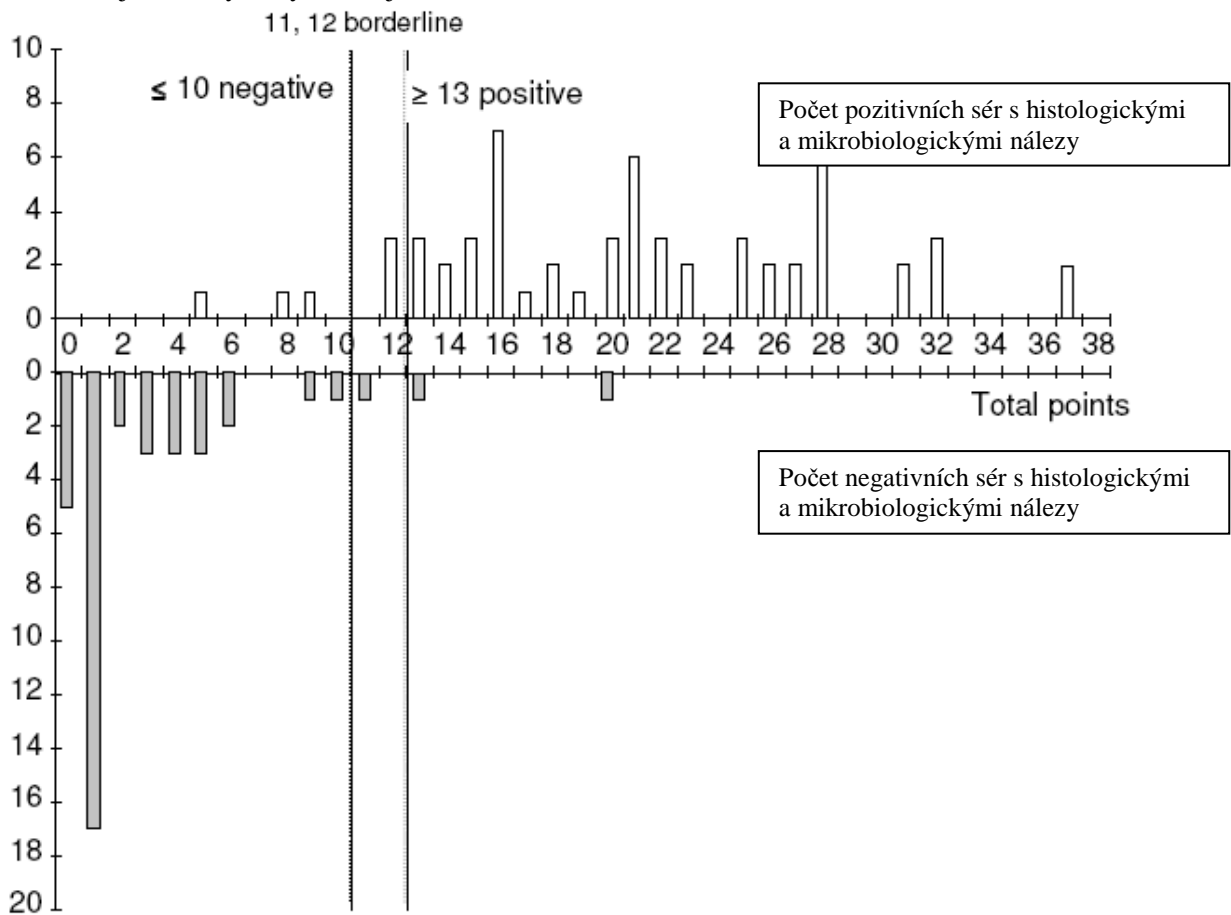
Pomocí počítačové simulace byl výklad testu optimalizován díky hodnocení specifičnosti jednotlivých antigenů v případě pozitivních sér. Jednotlivým antigenům byly přiřazeny bodové hodnoty a výsledek testu byl stanoven jako součet jednotlivých hodnot. V případě optimálního navržení bodové hodnoty dojde ke zlepšení specifičnosti při vysoké citlivosti. Viz ověřovací zkoušky (Tabulka 15).

		Histology/ culture		
		neg	pos	
Immunoblot	neg	38	3	41
	pos	2	56	58
		40	59	99
Specificity:		95%		
Sensitivity:		95%		

Tabulka 15: Korelace Immunoblotu Helicobacter IgG s histologickými a mikrobiologickými nálezy pomocí optimalizovaného přepočtu.

Výsledkem optimalizace je, že počet sporných hodnocení může být zřetelně sníženo na minimum. To zvyšuje bezpečnost při přípravě sérologických výsledků a zahájení specifické terapie *H. pylori* patogenů.

Porovnání jednotlivých výsledků je uvedeno na Obr. 1.



Obrázek 1: Porovnání jednotlivých výsledků u Immunoblotu Helicobacter IgG s histologickými a mikrobiologickými nálezy.

12.2. Hodnocení IgA

Optimalizace pro IgA byla provedena podobně jako u testu IgG. Výsledek je uveden v tabulce 16.

		Histology/ culture		
		neg	pos	
Immunoblot	neg	36	21	57
	pos	4	38	42
		40	59	99
Specificity:		90%		
Sensitivity:		64%		






Tabulka 16: Korelace Immunoblotu Helicobacter IgA s histologickými a mikrobiologickými nálezy pomocí optimalizovaného přepočtu.

13. Literatura

- (1) Marshall, B.J., Royce, H., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Taylor, N.S., Edmonds, P., Sly, L.I., Brenner, D.J. (1982) Original Isolation of Campylobacter pyloridis from human gastric mucosa. Microbios Letter 25: 83
- (2) Warren J.R. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet i: 1273 - 1275
- (3) Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vanderstetten, D.P., Chang, y., Vogelmann, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K. (1991) Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 325: 1127 - 1131
- (4) Stolte, M., Eidt, S. (1993) Healing gastric MALT lymphomas by eradicating H. pylori. Lancet 342:568
- (5) Stolte, M. (1992) Helicobacter pylori and gastric MALT lymphoma. Lancet 339: 745 - 746
- (6) Hentschel, E., Brandstatter, G., Dragosics, B., Hirschl, A.M., Nemeč, H., Schutze, K., Taufer, M., Wurzer, H. (1993) Effect of Ranitidine and Amoxicillin plus Metronidazole on the eradication of Helicobacter pylori and the recurrence of duodenal ulcer N Engl J Med 328: 308 - 312
- (6a) Bayerdörffer E, Oertel H, Lehn N, Kasper G, Mannes GA, Sauerbruch T, Stolte M: Topographic association between active gastritis and Campylobacter pylori colonisation. J Clin Pathol 1989, 42:834-839.
- (7) Stadelmann, O. (1995) Helicobacter pylori: Indikationen und Praxis der Therapie. Deutsches Ärzteblatt 92: 39 - 41
- (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. (1994) Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastrin disease.- J Exp. Med 179: 1653 - 1658
- (9) Lee, A. (1993) H. pylori initiated ulcerogenesis: look to the host. Lancet 341: 281
- (10) Schmitt, W., Haas, R. (1994) Genetic analysis of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin - structural similarities with the IgA protease type of exported protein. Mol Microbiol 12: 307 - 319
- (11) Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrioni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., Rappuoli, R. (1993) Molecular characterization of the 128kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. PNAS 90: 5791 - 5795
- (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 cag A is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. (1995) Infect Immun 63: 94
- (13) Krakowka, S., Morgan, D.R., Kraft, W.G., Leunk, R.D. Establishment of gastric Campylobacter pylori infection in the neonatal gnotobiotic piglet (1987) Infect Immun 55: 2789 - 2796
- (14) Karita, M., Li, Q., Cantero, D., Okita, K. Establishment of a small animal model for human Helicobacter pylori infection using germ-free mice (1994) Am J Gastroenterol 89: 208 - 213
- (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 (1995) Science 267: 1655 - 1658

- (16) Noach LA, Langenberg WL, Bertola MA, Dankert J, Tytgat GN: Impact of metronidazole resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. (1994) *Scand J Infect Dis* 26:321-327.
- (17) Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, Stolte M: Regression of primary gastric lymphoma of mucosaassociated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1995, 345:1591-1594.
- (18) Bayerdörffer E, Mannes GA, Sommer A, Höchter W, Weingart J, Hatz R, Lehn N, Ruckdeschel G, Dirschedl P, Stolte M: Long-term follow-up after eradication of *Helicobacter pylori* with a combination of omeprazole and amoxicillin. *Scand J Gastroenterol* 1993, 28:19-25.
- (19) Tummuru MKR, Sharma SA, Blaser MJ: *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Molecular Microbiology* 1995, 18 (5): 867 - 876. (20)

14. Vysvětlivky symbolů

	Počet testů v soupravě
EVALFORM	Vyhodnocovací formulář
INSTRU	Návod k použití
	Podívejte se do pracovního postupu
CONT	Obsah soupravy
IVD	<i>In vitro</i> diagnostická souprava
LOT	Číslo šarže
	Nezmrazujte
REF	Katalogové číslo
	Použitelné do uvedené doby expirace
	Teplotní limitace. Skladujte při x-y°C

15. Kontakty

Výrobce:

ALL.DIAG

10, rue Ettore Bugatti – BP6

67038 Strasbourg Cedex 2

tel: 03 88 78 80 88, fax: 03 88 78 76 78

www.alldiag.com; info@alldiag.com

Dodavatel:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 78b, 612 00 Brno

Tel: +420 541 243 113, Fax: +420 541 243 114

email: laboserv@laboserv.cz

http://www.laboserv.cz