Helicobacter pylori
CagA-Ag IgA

ELISA set pro kvantitativní stanovení protilátek IgA proti Helicobacter pylori CagA-Ag v séru nebo v plazmě

- Pouze pro diagnostiku "in vitro" -

96 testů **Kód. CAGA.CE**

A. ÚVOD

Helicobacter pylori (Hp) je gramnegativní bakterie, poprvé izolovaná ze žaludeční sliznice v roce 1983 Marshallem a Warrenem. Bylo zjištěno, že H. pylori je zodpovědná za většinu případů poškození žaludeční sliznice a hraje důležitou roli při vývoji onemocnění žaludku vedoucích k nádorovým onemocněním.

V poslední době se objevily virulentní kmeny, které produkují cytotoxin tvořený mononomery o molekulární hmotnosti 87 kDa, způsobující vakuolizaci epiteliálních buněk (VacA toxin) a těžké poškození žaludeční sliznice. Byl zaznamenán výskyt proteinu, který VacA provází, který je produkován v kmenech nesoucích příbuzný gen a který vykazuje molekulární hmotnost 128 KDa.

Tento protein, pojmenovaný CagA-Ag je imunogenní, čímž stimuluje tělo pacienta k produkci specifických protilátek tříd IgG i IgA. Jejich výskyt v těle pacienta se považuje za klinický signál přítomnosti vysoce virulentního kmene Helicobacter pylori a v případě přítomnosti IgA za signál akutně probíhající infekce.

B. PRINCIP TESTU

Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy syntetickými CagA antigeny, během první inkubace se na tuto pevnou fázi navážou protilátky CagA-Ag IgA, pokud jsou ve vzorku přítomny.

Po vymytí ostatních složek vzorku, se během druhé inkubace detekuje navázaná protilátka anti-CagA IgA přidáním protilátky anti-hIgA, označené křenovou peroxidázou (HRP).

Enzym zachycený na pevné fázi působící na směs substrát/chromogenu generuje optický signál, jež je přímo úměrný množství protilátek anti-CagA-Ag IgA obsažených ve vzorku.

Množství IgA ve vzorku je kvantifikováno sadou standardů, které jsou kalibrovány v absolutních jednotkách na mililitr (Uarb/ml), neboť neexistuje zatím žádná mezinárodní jiná norma. Interference způsobené přítomností IgG se jsou blokovány přímo v jamce přidáním adsorbentu anti-hIgG.

C. PODMÍNKY TESTU A UPOZORNĚNÍ

1. Všechna činidla obsažená v této soupravě jsou určena pouze pro "in vitro" diagnostiku.

2. Soupravu ani její komponenty nepoužívejte po vypršení doby exspirace uvedené na nálepkách. Nemíchejte komponenty z různých souprav mezi sebou.

3. Máte-li dosáhnout spolehlivé výsledky pro klinickou interpretaci, je nutné provádět procesy pečlivě.

4. Před začátkem testů ponechejte všechny reagencie při pokojové teplotě po dobu alespoň 60 minut.

5. Zabraňte vzájemné kontaminaci reagencií. Používejte automatické pipety s jednorázovými špičkami. Nedotýkejte se při pipetování hroty špiček stěn jamek mikrotitrační destičky.

6. K promývání používejte promývací roztok dodávaný jako součást soupravy a pečlivě dodržujte všechny pokyny uvedené v kapitole " I. POKYNY PRO PROMÝVÁNÍ" tohoto příbalového letáku.

7. Zabezpečte, aby se směs substrát/chromogenu nedostala do kontaktu s oxidačními činidly nebo kovovými povrchy. Během inkubace a přípravy směsi zabraňte osvícení chemikálií prudkým světlem. Pro přípravu směsi používejte pouze čisté nebo sterilní plastové nádoby na jedno použití.

8. Se vzorky a materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními, mohou přenášet infekci.

Všechny předměty, které přišly do kontaktu se vzorky, a se zbytky po rozboru, musí být ošetřeny nebo zlikvidovány jako infekční. Nejlepší způsob inaktivace je ošetření v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 30 minut, nebo 2,5% roztokem chlornanu sodného po dobu 24 hodin. Tuto metodu můžete použít pro likvidaci tekutého odpadu poté, co byl neutralizován hydroxidem sodným (NaOH).

9. Vyhněte se kontaktu reagencií s pokožkou nebo sliznicí. V souladu s laboratorními bezpečnostními předpisy, používejte vždy ochranné rukavice, brýle a ochranný laboratorní plášť.

D. SLOŽENÍ SOUPRAVY

a – Stripová mikrotitrační destička 1 ks

Dvanáct 8-jamkových stripů pokrytých syntetickým antigenem CagA. Destička je zatavena v sáčku s vysoušedlem. Před použitím ji ponechejte při pokojové teplotě, zabráníte tak kondenzaci vlhkosti v sáčku.

b – Enzymatický konjugát (tracer) 1 ampule o 0,8 ml

Proteinový pufr obsahující specifickou protilátku anti-hIgA značenou HRP. Roztok je připravený k okamžitému použití. Jako konzervans přísady obsahuje 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,3% Kathonu GC.

c – Ředící roztok konjugátu 1 ampule o 16 ml

Proteinový pufr pro ředění koncentrátu konjugátu. Jako konzervační přísady obsahuje 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,3% Kathonu GC.

d – Promývací roztok 1 ampule o 60 ml

20x koncentrovaný roztok fosfátového pufru. Ředí se deionizovanou vodou na objem 1200 ml. Obsahuje konzervační přísady Tween 20 a Kathon GC.

e – Chromogen 1 ampule o 8 ml

Roztok tetramethylbenzidinu (TMB) s aktivátory a stabilizátory ve fosfát/citrátovém pufru.

Pozor: Skladujte v temnu.

f – Substrát 1 ampule o 8 ml

Stabilizovaný roztok peroxidu vodíku ve fosfát/citrátovém pufru.

g – Stop roztok 1 ampule o 16 ml

Obsahuje roztok 0,3 molární kyseliny sírové.

Pozor : Dráždivá látka! (Xi. R36/38 S2,26,30)

h – Ředicí roztok 2 ampule po 60 ml
Proteinový roztok pro ředění vzorků. Obsahuje detergent, proteinové stabilizátory, 0,1% azid sodný a 3% Kathon GC jako konzervační přísady.
i – Neutralizační reagens 1 ampule o 8 ml
proteinový roztok pro neutralizaci IgG ve vzorcích. Obsahuje detergent, proteinové stabilizátory, 0,1% azid sodný a 3% Kathon GC jako konzervační přísady.
l – Sada standardů 6 ampulí po 2 ml
řada standardů kalibrovaných v absolutních jednotkách na mililitr. Připraveno k okamžitému použití. **Koncentrace:** 0-5-10-20-50-100 Uarb/ml
h – Plastová fólie 2 ks
Průhledné folie určené pro zakrytí mikrotitračních destiček při inkubaci při teplotě +37°C.

Poznámka: Veškeré materiály vytvořené z lidského séra byly otestovány jako negativní na protilátky HbsAg, HCV a HIV testovacími sadami schválenými institutem FDA.

E. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

1. Souprava musí být skladována při teplotě 2-8°C, a musí být použita před vypršením doby exspirace uvedené na obalu soupravy.
2. Nepoužité stripy musí být vráceny do sáčku s vysoušedlem a pevně uzavřeny lepicí páskou dříve, než budou uloženy při teplotě 2-8°C. Po otevření sáčku jsou zbylé stripy použitelné, dokud se vysoušedlo nezbarví růžově.
3. Zředěný promývací roztok je stabilní při pokojové teplotě po 1 týden, při teplotě 2-8°C 3 týdny.
4. Směs chromogen/substrátu je při pokojové teplotě stabilní 4 hodiny, pokud není vystavena světlu.
5. Zředěný konjugát je při teplotě 2–8 °C stabilní 1 týden, pokud je uložen ve sterilní nádobě na jednorázové použití.
6. Všechny ostatní kapalné reagenty jsou stabilní při teplotách 2-8 °C do exspirace, pokud se s nimi zachází tak, aby nedošlo k jejich kontaminaci.

F. NEDODÁVANÉ POTŘEBY

1. Mikropipety 10, 100 a 1000 µl.
2. Vortex a savé papíry.
3. Deionizovaná voda.
4. Minutky.
5. ELISA reader o alespoň 2 OD s filtry o optické hustotě 450 nm a 620-630 nm.
6. Inkubátor a příslušenství pro teplotu +37°C.
7. Automatická ELISA promývačka nebo ruční zařízení schopné dávat 300 µl a odsávat.

G. VZORKY

Sérum a plasma - pro analýzu je možno použít čerstvé krevní sérum nebo plazmu. Vzorky séra nebo plasmy musí být čiré a nesmí být kontaminované žádnými mikroorganismy. Pokud je to nutné, odstraňte znečišťující částice v centrifuze při 2 000 g x 20 min při pokojové teplotě, nebo filtrací přes filtr 0,22 µm. Vzorky lipemické, ikterické nebo hemolyzované se nesmějí používat, protože při rozboru mohou zavinit chybné výsledky. Pokud nejsou použity okamžitě, můžou být skladovány při teplotě 2-8°C po dobu 1 týdne. V případě delšího skladování je uchovávejte při teplotě -30°C. Nezmrazujte vzorky opakovaně, protože IgA by se mohl zničit.
Stolice - k 0,2 g vzorku v plastové zkumavce na jedno použití přidejte 1 ml ředicího roztoku. Směs míchejte intenzivně na vortexu po dobu 1 minuty a pak nechte směs odstát po dobu 5 – 10 minut, aby těžké částice mohly sedimentovat. Množství potřebné pro test pak odeberte z povrchu suspenze a použijte jej k testu.
Vzorky musí být zředěny v poměru 1:101 (tj. 10 µl + 1000 µl ředicím roztokem.

H. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

a – Promývací roztok: 60ml koncentrátu přeneste do odměrné baňky a doplňte na 1200 ml deionizovanou vodou.
b – Konjugát: koncentrát konjugátu zřeďte ředicím roztokem indikátoru v poměru 1:20. Před použitím roztok pečlivě promíchejte ve vortexu. Připravte si pouze množství nezbytné pro analýzu.
c – Chromogen/Substrát: tuto směs si připravte asi 5 minut před použitím do plastové nádoby na jedno použití. Smíchejte 1 díl chromogenu s 1 dílem substrátu. Připravte si pouze množství nezbytné k testu.

I. POKYNY PRO PROMÝVÁNÍ

Chcete-li získat správná a přesná analytická data, je důležité dodržovat správný postup promývání.
Doporučujeme používat dobrou promývačku mikrotitračních destiček. Doporučujeme promývací systém kalibrovat a tak udržovat v perfektním stavu.
Obecně platí, že máte-li mít jistotu, že neobdržíte falešně pozitivní reakce, postačí 4 až 5 promývacích cyklů o objemu 300 µl/jamku.
V případě manuálního promývání navrhujeme provádět vždy 5 promývacích cyklů s objemem 300 µl/jamku.
V každé případě musí být kapalina odsátá ze stripů zlikvidována jako odpad teprve poté, co byla ošetřena roztokem chlornanu sodného s konečnou koncentrací 2,5 % po dobu 24 hodin.

J. PRACOVNÍ SCHÉMA

Důležité poznámky:

- Nechte vytemperovat všechny komponenty soupravy na pokojovou teplotou, pečlivě promíchejte všechny kapalné reagencie na vortexu.
- Nemíchejte reagencie z různých výrobních šarží.
- Doporučujeme dávkovat kalibrátory v duplikátu.
- Dávkování a doba inkubace musí být pro všechny jamky destičky stejné. Vyhněte se delším přestávkám mezi jednotlivými kroky.
- Předcházejte kontaminaci promývacím roztokem tím, že stripy při ručním promývání opatrně oklepnete na podložku se savého papíru.
- Barva, kterou vzorek získá při inkubaci, je ve tmě stabilní maximálně po dobu jedné hodiny.
- Doporučujeme číst destičku při 450 nm (čtecí filtr) a blankovat při 620-630 nm.
- Jamku A1 použijte jako BLANK.

1 – Jamku **A1** ponechte prázdnou pro **BLANK**. **Předřeďte vzorky** ředicím roztokem v poměru **1:101** (10 µl vzorku + 1 000 µl ředicího roztoku). Pipetujte

100 µl předředěného vzorku do jamek. Standardy neřeďte, jsou připraveny k okamžitému použití.
Pipetovací schéma:

A1	slepý vzorek (BLANK)
B1+C1	100 µl standard 1
D1+E1	100 µl standard 2
F1+G1	100 µl standard 3
H1+A2	100 µl standard 4
B2+C2	100 µl standard 5
D2+E2	100 µl standard 6
F2…H12	100 µl vzorky

Do jamek ke vzorkům přidejte **50 µl neutralizačního činidla**. Ke standardům jej nepřidávejte.
Mikrotitrační destičku přikryjte plastovou folií a inkubujte při **+37°C po dobu 60 minut.**.
2 – Sejměte folii a promyjte mikrotitrační destičku dle pokynů k promývání (kap. I).
3 – Přidejte **100 µl naředěného konjugátu** do všech jamek kromě jamky A1. Zakrytou mikrotitrační destičku inkubujte **60 min při +37°C**.
4 – Sejměte folii a promyjte mikrotitrační destičku dle pokynů k promývání (kap. I).
Připravte si směs chromogen/substrátu.
5 – Přidejte **100 µl směsi chromogenu/substrátu** do všech jamek včetně A1. Inkubujte mikrotitrační destičku **20 min při pokojové teplotě.** Chraňte destičku před světlem.
6 – Zastavte enzymatickou reakci přidáním **100 µl stop roztoku** do všech jamek včetně jamky A1.
Změřte destičku **ELISA readerem při 450 nm** a 620-630 nm, jamku A1 použijte jako BLANK.

M. PLATNOST ANALÝZY

Test je považován za platný, pokud:
1. Hodnota OD450nm jamky A1 BLANKu je menší než 0,100.
2. Po odečtení BLANKu je průměrná hodnota standardu 0 Uarb/ml menší než 0,200.
3. Průměrná hodnota standardu 100 Uarb/ml je větší než 1,000.
4. Průměrná hodnota Standardu 5 Uarb/ml je vyšší než hodnota pro 0 Uarb/ml

V případě, že získaná data neodpovídají správným hodnotám (výše uvedeným), zkontrolujte před opakováním testu datum exspirace použité sady, funkčnost nástrojů použitých pro práci při testu, a postup pipetování reagentů a vzorků do jamek.

N. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Pokud je test platný, vytvořte kalibrační křivku pomocí Vašeho systému a odečtěte z ní koncentrace vzorků.
Hodnotu 5 Uarb/ml lze použít jako hraniční hodnotu pro rozlišení mezi IgA negativní a IgA pozitivní populací. Rozmezí 0 a 5 Uarb/ml se považuje za šedou zónu. Vzorky vykazující vyšší hodnoty než 10 Uarb/ml se považují za pozitivní na anti-CagA IgA. Jejich přítomnost svědčí o aktivní infekci (VacA pozitivní) patogenním kmenem Helicobacter Pylori.

Cod. CAGA.CE

Příklad standardní křivky

0	Uarb/ml	0,050	OD 450 nm
5	Uarb/ml	0,300	OD 450 nm
10	Uarb/ml	0,500	OD 450 nm
20	Uarb/ml	1,000	OD 450 nm
50	Uarb/ml	2,100	OD 450 nm
100	Uarb/ml	2,800	OD 450 nm

O. PARAMETRY TESTU

CITLIVOST: Citlivost testu byla stanovena na panelu serokonverzních a pozitivních vzorků a porovnáním s výsledky soupravy schválené FDA. Tento test vykazuje citlivost vyšší než 98 %.
PŘESNOST: specifita testu byla stanovena na panelu pozitivních vzorků vyšetřených soupravou schválenou FDA. Tento test vykazuje specifitu vyšší než 98 % pro plazmu a pro sérum.
REPRODUKOVATELNOST: Reprodukovatelnost byla stanovena pomocí negativních a pozitivních standardů opakovaně testovaných v různé dny. Byly obdrženy kontrolní hodnoty mezi 4 – 12 %.

P. LITERATURA

1. Warren J.R. et al.. Lancet (1983), 45, 1273-1275
2. Goodwin C.S. et al.. Int.Syst.Bacteriol. (1989), 39, 397-405
3. Blaser M.J. et al.. Gastroenterology (1987), 93, 371-383
4. Dooley C.P. eta al.. N.Engl.J.Med. (1989), 321, 1562-1566
5. Parsonnet J. Et al.. N.Engl.J.Med. (1991), 325, 1127-1131
6. Leying H. et al.. Mol.Microbiol. (1992), 6, 2863-2874
7. Perez-Perez G.I. et al.. Infect.Immun. (1992), 60, 3658-3663
8. Cover T.L. et al.. J.Biol.Chem. (1992), 267, 10570-10575
9. Lenuk R.D. et al.. Rev.Infect.Dis. (1991), 13, 5685-5689
10. Crabtee J.E. et al.. J.Clin.Pathol. (1992), 45, 733-734
11. Cover T.L. et al.. Infect.Immun. (1990), 58, 603-610
12. Gerstenecker B. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol. (1992), 11, 595-601
13. Cussac V. et al.. J.Bacteriol. (1992), 174, 2466-2473

Tento výrobek byl vyroben firmou Dia. Pro s.r.l. pod dohledem zřízeným systémem řízení jakosti a prostředí, který splňuje požadavky norem UNI EN ISO 9002-UNI CEI EN 46002, a který byl certifikován TUV pod registračním číslem 501001146

Vyrábí: Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl. via Columella n° 31 – Milano – Italy			
Doc.:	INS CAGA.CE	Verze:	08/01
Schválil ved. odd. Jakosti::		L.Prati	

Dodává: LABOSERV, s.r.o. Hudcova 78b, 612 00 Brno, Česká republika			
Doc.:	CAGA.CE IgAcz	Verze:	12/02
Schválil ved. Odd. Jakosti:		M. Šišák	

Distributor:
LABOSERV s.r.o.
Hudcova 78b, 612 00 Brno
Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114
e-mail: laboserv@laboserv.cz