

**Helicobacter pylori****CagA-Ag IgG**

**ELISA souprava pro kvantitativní stanovení  
protilátek IgG Helicobacter pylori CagA-Ag**

- Pouze pro diagnostiku "in vitro" -

96 testů

Kód. CAGG.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 roli při vývoji onemocnění žaludku vedoucím k nádorovým onemocněním.

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

Tento protein, pojmenovaný CagA-Ag je imunogenní a stimuluje tělo pacienta k produkci specifických protilátek, jejichž přítomnost může mít vztah k vysoce virulentní infekci.

**B. PRINCIP TESTU**

Test je používán k detekci IgG protilátek anti-CagA-Ag, které mají vztah k přítomnosti virulentních kmenů Helicobacter pylori v organismu.

Stěny jamek mikrotitrační destičky jsou pokryty syntetickými CagA antigeny, během první inkubace se na této pevné fázi zachytí protilátka CagA-Ag IgG, pokud jsou v testovaném vzorku přítomny.

Po vymytí zbylých složek vzorku, se během druhé inkubace detekuje navázaná protilátka anti-CagA IgG přidáním anti-hIgG, značená peroxidázou (HRP).

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

IgG ve vzorku je kvantifikováno pomocí sady standardů, které jsou kalibrovány v absolutních jednotkách na mililitr (Uarb/ml), neboť zatím neexistuje žádná mezinárodní norma na jejich kalibraci.

**C. PODMÍNKY TESTU A POZNÁMKY**

1. Všechna činidla obsažená v této soupravě jsou určena pouze pro "in vitro" diagnostiku.
2. Soupravu ani její komponenty nepoužívejte po vypršení doby expirace uvedené na nálepkách. Nemíchejte komponenty z různých sad mezi sebou.
3. Máte-li dostat spolehlivé výsledky pro klinickou interpretaci, je nutné provádět všechny procesy pečlivě.
4. Před začátkem testů ponechejte alespoň 60 minut všechny komponenty při pokojové teplotě.

5. Zabraňte vzájemné kontaminaci reagensů. Používejte automatické pipety s jednorázovými špičkami. Nedotýkejte se špičkami pipet stěn jamek mikrotitračních destiček.

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

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

8. Se vzorky a ostatními materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními, neboť mohou přenášet infekci. Všechny předměty, které přišly do kontaktu se vzorky, a se zbytky po rozboru musí být ošetřeny nebo zlikvidovány jako potenciálně 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 jakémukoli kontaktu reagensů s pokožkou nebo sliznicí. V souladu s bezpečnostními laboratorními 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 v zataveném sáčku s vysoušedlem. Před použitím ji ponechejte při pokojové teplotě, zabráníte kondenzaci vlhkosti v sáčku.

**b – Enzymatický konjugát (CONJ 20X)**

1 ampule o 0,8ml

Proteinový pufr obsahující specifickou protilátku anti-hIgG značenou HRP. Roztok je připravený k okamžitému použití. Jako konzervans obsahuje proteinové stabilizátory, 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,1% Kathonu GC.

**c – Ředící roztok konjugátu (CONJ DIL)**

1 ampule o 16ml

Proteinový pufr pro ředění koncentráту konjugátu. Jako konzervans obsahuje 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,1% Kathonu GC.

**d – Promývací roztok (WASHBUF 20X)**

1 ampule o 60 ml

20x koncentrovaný roztok fosfátového pufru. Ředí se deionizovanou vodou na 1 200 ml. Jako konzervans Tween 20 a Kathon GC.

**e – Chromogen (SOLN TMB)**

1 ampule o 8 ml

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

**Pozor:** Skladujte v temnu.

**f – Substrát (SOLN H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

1 ampule o 8 ml

Stabilizovaný roztok peroxidu vodíku ve fosfát/citrátovém pufru.

**g – Stop roztok (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3M)**

1 ampule o 15 ml

Obsahuje roztok 0,3 molární kyseliny sírové.

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

**h – Ředící roztok (DILSPE)** 2 ampule po 60 ml  
Proteinový roztok pro ředění vzorků. Obsahuje detergent, proteinové stabilizátory, 0,1% azid sodný a 0,1% Kathon GC jako konzervační přísady.

**g – Sada standardů (CAL1...6)** 6 ampulí po 2 ml  
sada roztoků kalibrováných v absolutních jednotkách na mililitr. Připravené pro okamžité použití. Koncentrace: 0-5-10-20-50-100 Uarb/ml

**h – Plastová fólie** 2 ks  
Průhledné folie, určená 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 expirace uvedené na obalu.
2. Nepoužité stripy musí být vráceny do sáčku s vysoušedlem a pevně uzavřeny lepicí páskou dřívě, než budou uloženy při teplotě 2-8°C. Po prvním otevření sáčku jsou stripy použitelné, pokud vysoušedlo není zabarveno růžově.
3. Zředěný promývací roztok je stabilní 1 týden při teplotě 2-8°C.
4. Směs chromogen/substrátu je při pokojové teplotě stabilní 4 hodiny, pokud není vystavena světlu.
5. Zředěný konjugát není stabilní. Naředte pouze množství nutné k provedení testu.
6. Všechny ostatní kapalné reagensie jsou stabilní při teplotách 2-8 °C do expirace, 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 2 OD, s filtry o optické hustotě 450 nm a 620-630 nm.
6. Inkubátor a příslušenství pro teplotu +37°C.
7. ELISA promývačka nebo ruční zařízení schopné dávat 300 µl a odsávat.

## G. VZORKY

Pro analýzu je možno použít čerstvé sérum nebo plazmu. Pokud se vzorky nevyšetřují okamžitě, mohou být skladovány při teplotě 2-8°C po dobu 1 týdne. V případě delšího skladování je uchovávejte při -30°C. Nezmrazujte vzorky opakovaně, protože IgM by se mohl zničit. Vzorky musí být čiré a nesmí být kontaminované 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 vzorky se nesmějí používat, protože mohou dávat chybné výsledky.

Cod. CAGG.CE

## H. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

**a – Promývací roztok:** 60ml koncentrátu přeneste do odměrné baňky a doplňte na 1200 ml deionizovanou vodou.

**b – Konjugát:** koncentrát konjugátu zředte ředícím 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 navrhuje provádět vždy 5 promývacích cyklů s objemem 300 µl/jamku.

V každé případě platí, že kapalina odsátá ze stripů, smí být náležitým způsobem zlikvidována jako odpad teprve poté, co byla ošetřena roztokem chlornanu sodného s konečnou koncentrací 2,5 % po dobu 24 hodin.

## J. PRACOVNÍ SCHEMA

### Důležité poznámky:

- Nechte vytemperovat všechny komponenty soupravy na pokojovou teplotou, pečlivě promíchejte všechny kapalné reagensie na vortexu.
- Nemíchejte reagensie 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. Předředte vzorky** ředícím roztokem v poměru **1:101** (10 µl vzorku + 1 000 µl ředícího roztoku). Pipetujte **100 µl předředěného vzorku** do jamek. Standardy neředte, 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

Mikrotitrační destičku přikryjte folií, a inkubujte při +37°C po dobu 60 minut..

2 – Sejměte folii a promyjte mikrotitrační destičku dle pokynů k promývání (kap. I). V mezičase si nařeďte kojnuagát podle pokynů v kap. H. Příprava reagensí.

3 – Přidejte 100 µl zředěného 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 chromogenu/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:

- Hodnota OD450nm jamky A1 BLANKu je menší než 0,100.
- Po odečtení BLANKu je průměrná hodnota standardu 0 Uarb/ml menší než 0,200.
- Průměrná hodnota standardu 100 Uarb/ml je větší než 1,000.
- Průměrná hodnota Standardu 5 Uarb/ml je vyšší než hodnota pro 0 Uarb/ml

V případě, že Vámi získaná data neodpovídají správným hodnotám (výše uvedeným), zkontrolujte před opakováním testu datum expirace použité sady, funkčnost nástrojů použitých pro práci při testu, a postup pipetování reagensí 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 IgG negativní a IgG pozitivní populací. Rozmezí 0 a 5 Uarb/ml považujte za šedou zónu. Vzorky vykazující vyšší hodnoty než 10 Uarb/ml se považují za pozitivní na anti-CagA IgG. Jejich přítomnost svědčí o aktivní infekci (VacA pozitivní) patogenním kmenem *Helicobacter Pylori*.

### Příklad standardní křivky

0	Uarb/ml	0,050	OD 450 nm
5	Uarb/ml	0,300	OD 450 nm
10	Uarb/ml	0,550	OD 450 nm

Cod. CAGG.CE

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 negativních a 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 kontrol opakovaně testovaných v různé dny. Byly obdrženy kontrolní hodnoty mezi 4 – 12 %.

## P. LITERATURA

- Warren J.R. et al.. Lancet (1983), 45, 1273-1275
- Goodwin C.S. et al.. Int.Syst.Bacteriol. (1989), 39, 397-405
- Blaser M.J. et al.. Gastroenterology (1987), 93, 371-383
- Dooley C.P. et al.. N.Engl.J.Med. (1989), 321, 1562-1566
- Parsonnet J. Et al.. N.Engl.J.Med. (1991), 325, 1127-1131
- Leying H. et al.. Mol.Microbiol. (1992), 6, 2863-2874
- Perez-Perez G.I. et al.. Infect.Immun. (1992), 60, 3658-3663
- Cover T.L. et al.. J.Biol.Chem. (1992), 267, 10570-10575
- Lenuk R.D. et al.. Rev.Infect.Dis. (1991), 13, 5685-5689
- Crabtree J.E. et al.. J.Clin.Pathol. (1992), 45, 733-734
- Cover T.L. et al.. Infect.Immun. (1990), 58, 603-610
- Gerstenecker B. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol. (1992), 11, 595-601
- 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 CAGG.CE	Verze:	11/2003
-------	----------------	--------	---------

### Dodává:

LABOSERV, s.r.o.  
Hudcova 78b, 612 00 Brno, Česká republika

Doc.:	CAGA.CE IgGcz	Verze:	11/2003
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](mailto:laboserv@laboserv.cz)