

Helicobacter pylori

Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekce Helicobacter pylori

ELISA, IMUNOBLOT a **MICROBLOT-ARRAY** soupravy jsou určeny ke stanovení specifických protilátek třídy IgA, IgG a IgM v lidském séru nebo plazmě

Diagnostické médium pro rychlé stanovení ureázové aktivity v biotickém vzorku

Úvod

Helicobacter pylori řadíme do rodu *Helicobacter*. Morfologicky se jedná o gramnegativní, aerobní mikroaerofilní tyčky. Jako patogen se uplatňuje při infekcích žaludeční sliznice, a to zejména v oblasti antra a duodena. Je původcem chronické gastritidy typu B, na jejímž podkladě se může později rozvinout vředová choroba. U tohoto onemocnění je *H. pylori* prokazován takřka ve 100% případů. Infekce *H. pylori* je často provázena dyspeptickými potížemi. Aktivní chronická gastritida může přejít ve formu atrofickou s rizikem vzniku žaludečního karcinomu.

Faktory patogenity *H. pylori* vycházejí jednak ze samotné morfologické struktury bakteriální buňky (spirální tvar, bičíky) a dále ze schopnosti produkce extracelulárních enzymů a cytotoxinů (např. ureáza, kataláza, proteázy, VacA, CagA).

Vyskytuje se řada patogenních a fakultativně patogenních kmenů. Jejich virulence se liší jednak zastoupením výše zmíněných faktorů, tak i jejich množstvím. Na patogenezi onemocnění se podílí i odpověď hostitele. Rezistentní kmeny se izolují hlavně od neúspěšně léčených osob.

Diagnostika onemocnění

Metody k detekci lze rozdělit na invazivní a neinvazivní. K nejužívanějším invazivním metodám patří histologické a cytologické vyšetření z bioptického vzorku žaludeční sliznice a rychlý ureázový test. K neinvazivním metodám patří dechový test a sérologické metody (stanovení protilátek třídy IgA, IgG, IgM). Neinvazivní testy jsou vhodné pro sledování efektivity terapie, vyhledávání infekce a reinfekce. Eradikace mikroba je následována poklesem hladiny protilátek. Vysoce specifické a citlivé metody molekulární biologie (PCR) se provádějí pouze na specializovaných pracovištích.

Diagnostický význam specifických protilátek

IgM: Jsou zvýšeny zejména v akutní fázi onemocnění, nevyskytují se však u všech nemocných.

IgA: Protilátky jsou přítomny nejen v akutní fázi onemocnění, ale i při chronické infekci žaludeční sliznice spolu s protilátkami třídy IgG. Jejich zvýšení je popsáno také u pacientů s rizikem karcinomu žaludku.

IgG: Přítomnost potvrzuje kontakt s *H. pylori*, není však indikátorem aktivity infekce. Sérokonverze nastává cca 2 měsíce po primoinfekci.

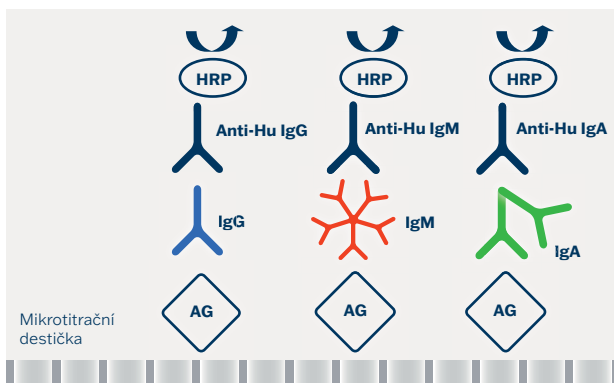
Stanovení ureázové aktivity v bioptickém vzorku žaludeční sliznice

Vlivem ureázové aktivity většiny kmenů *H. pylori* dochází v diagnostickém médiu k hydrolýze močoviny za vzniku amoniaku vedoucí ke zvýšení pH, které je indikováno změnou zbarvení pH indikátoru z barvy žluté na červenou.

ELISA

Princip testu

Soupravy jsou založeny na sendvičovém typu ELISA metody.



Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
	2. Dávkování kalibrátorů a ředěných vzorků 100 µl – blank = prázdná jamka
	3. Inkubace 30 min. při 37 °C
	4. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	5. Dávkování Konjugátu 100 µl – blank = prázdná jamka
	6. Inkubace 30 min. při 37 °C
	7. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	8. Dávkování substrátu 100 µl (TMB-Complete) – včetně blanku
	9. Inkubace 30 min. při 37 °C
	10. Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl – včetně blanku
	11. Fotometrické měření při 450 nm

Antigeny

Klinicky signifikantní kmen *H. pylori* s vysokým obsahem proteinů CagA (120 kDa) a VacA (87 kDa)

Použití souprav

- Vyhledávací test k průkazu specifických IgA, IgG a IgM protilátek v lidském séru nebo plazmě
- Semikvantitativní výsledky lze použít ke kontrole úspěšnosti terapie
- Diagnostika fáze onemocnění

Uživatelský komfort

- Komponenty v pracovním ředění
- Barevně odlišené reagentie
- Zaměnitelnost komponent
- Barevně značené stripky s odlamovacími jamkami
- CUT-OFF kontrola a kalibrátory
- Semikvantitativní hodnocení výsledků (Index positivity-IP) nebo kvantitativní vyhodnocení výsledků (U/ml)

Výhody souprav

- Vysoká diagnostická účinnost
- Dobrá reprodukovatelnost
- Vysoká dynamika testů
- Identický pracovní postup
- Celková doba vyšetření 1,5 hodiny
- Možnost nezávislé verifikace (CKS)
- Komplexní zákaznický servis

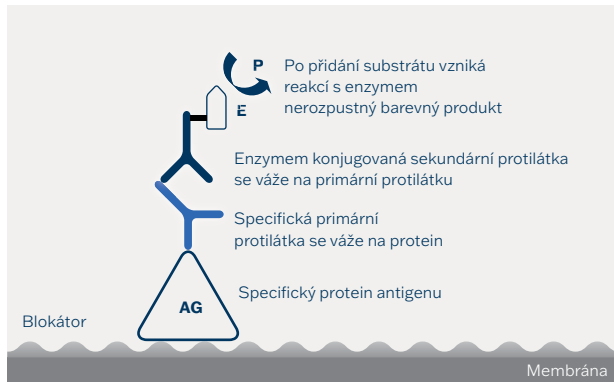
Charakteristiky souprav

Parametr	Diagnostická citlivost	Diagnostická specifita
EIA Helicobacter MONO IgA	98,7 %	98,8 %
EIA Helicobacter MONO IgG	98,9 %	98,8 %
EIA Helicobacter MONO IgM	97,5 %	97,4 %

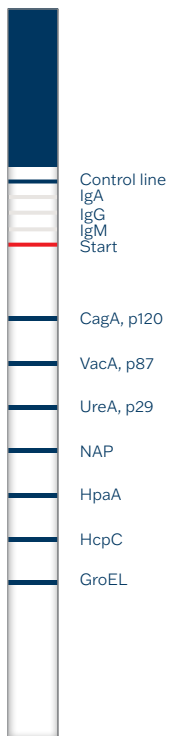
IMUNOBLLOT

Princip testu

Rekombinantní antigeny *H. pylori* jsou přeneseny na nitrocelulózovou membránu.



Antigeny



CagA, p120 – Cytotoxin associated gene A, vysoce specifický, faktor virulence

VacA, p87 – Vacuolating cytotoxin A, vysoce specifický, faktor virulence

UreA, p29 – lehká podjednotka ureázy, specifický, faktor virulence

NAP – Neutrophil-activating protein, faktor virulence, potenciační biomarker gastritidy

HpaA – Helicobacter pylori adhesin A, povrchový lipoprotein, potenciační marker gastritidy a žaludečních vředů

HcpC – Helicobacter cystein-rich protein, faktor virulence

GroEL – Chaperonin, protein teplotního šoku (Hsp 60), faktor virulence, je považován za marker chronické infekce

Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Dávkování Univerzálního roztoku 2 ml
	2. Smáčení stripů 10 min. při laboratorní teplotě – třepačka
	3. Odsátí
	4. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:51 (30 µl + 1,5 ml)
	5. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 1,5 ml
	6. Inkubace 30 min. při lab. teplotě – třepačka
	7. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 1,5 ml po 5 min. – třepačka
	8. Dávkování Konjugátu 1,5 ml
	9. Inkubace 30 min. při lab. teplotě – třepačka
	10. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 1,5 ml po 5 min. – třepačka
	11. Dávkování substrátu (BCIP/NBT) 1,5 ml
	12. Inkubace 15 min. při laboratorní teplotě – třepačka
	13. Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 2 ml po 5 min. – třepačka
	14. Nalepení a vyhodnocení stripů

Použití souprav

- Konfirmační metoda k ELISA testu
- Podrobné stanovení přítomnosti protilátek proti specifickým antigenům *H. pylori*

Uživatelský komfort

- Komponenty v pracovním řadě
- Barevně odlišené reagenty
- Zaměnitelnost komponent
- Negativní a Pozitivní kontrola
- Kontrolní linie na stripu
- Možnost softwarového vyhodnocení

Výhody souprav

- Jednoduchá interpretace a reprodukovatelnost výsledků
- Vysoká diagnostická účinnost
- Vhodné pro automatické systémy
- Komplexní zákaznický servis

Charakteristiky souprav

<u>Parametr</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
BLOT-LINE Helicobacter IgA	95,2 %	93,9 %
BLOT-LINE Helicobacter IgG	96,9 %	96,3 %

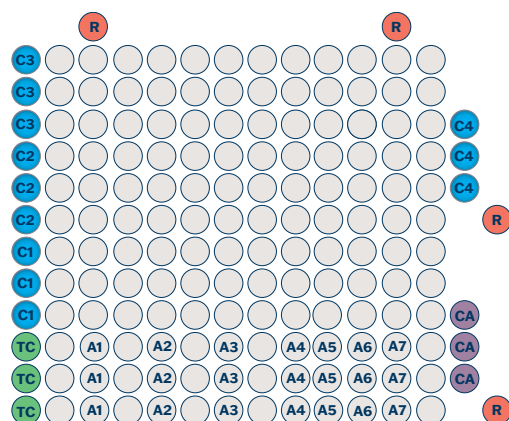
Klinická data

Korelace výsledků BLOT-LINE Helicobacter s ELISA a IMUNOBLOT testy

BLOT-LINE Helicobacter	shoda v %			
	IgG	počet vzorků	IgA	počet vzorků
EIA (TestLine)	92,2	90	84,4	90
EIA (Chorus)	94,1	34	84,9	33
BLOT (competition 1)	97,8	15	87,5	15
BLOT (competition 2)	100,0	15	80,0	15

MICROBLOT-ARRAY

Rozložení antigenů a kontrolních spotů



Popis antigenů

- A1** – CagA
- A2** – VacA
- A3** – UreA
- A4** – NAP
- A5** – HpaA
- A6** – HcpC
- A7** – GroEL

Popis kontrolních spotů

- R** – Reference
- TC** – Test control
- CA** – Conjugate control IgA
- CG** – Conjugate control IgG
- CM** – Conjugate control IgM
- C1** – Calibration 1
- C2** – Calibration 2
- C3** – Calibration 3
- C4** – Calibration 4

Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Dávkování Univerzálního roztoku 150 µl
	2. Smáčení 10 min při laboratorní teplotě
	3. Odsátí
	4. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:51 (10 µl + 500 µl)
	5. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl
	6. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	7. Rychlé promytí Univerzálním roztokem*
	8. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	9. Dávkování Konjugátu 100 µl
	10. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	11. Rychlé promytí Univerzálním <roztokem*
	12. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	13. Dávkování Substrátového roztoku (BCIP/NBT) 100 µl
	14. Inkubace 15 min při laboratorní teplotě
	15. Rychlé promytí destilovanou vodou*
	16. Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 200 µl po 5 min
	17. Vysušení a vyhodnocení

* v případě použití promývačky naplňte jamky po okraj a po naplnění poslední jamky ihned odsajte

Uživatelský komfort

- Nízká spotřeba vzorku
- Antigeny spotovány v tripletu - minimalizace chyby provedení
- Možnost automatického zpracování a vyhodnocení výsledků pomocí intenzity spotů (AU), pomocí IP či kvantitativní (U/ml)
- Paralelní vyšetření více markerů současně
- Vysoká citlivost a specifita

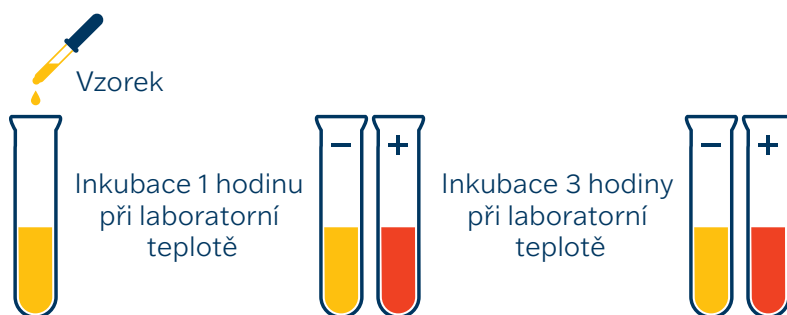


Charakteristiky souprav

<u>Parametr</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
Microblot-Array Helicobacter IgA	96,5 %	99,1 %
Microblot-Array Helicobacter IgG	97,4 %	99,0 %

STANOVENÍ UREÁZOVÉ AKTIVITY

Pracovní postup a vyhodnocení



Objednací údaje

ELISA

Kód	Název soupravy	Počet testů
HMA096	EIA Helicobacter MONO IgA	96
HMG096	EIA Helicobacter MONO IgG	96
HMM096	EIA Helicobacter MONO IgM	96
SK-HMA096	SmartEIA Helicobacter MONO IgA	96
SK-HMG096	SmartEIA Helicobacter MONO IgG	96
SK-HMM096	SmartEIA Helicobacter MONO IgM	96
xxxTLN	CKS negativní (dle seznamu na www.testlinecd.cz)	3,5 ml
xxxTLP	CKS pozitivní (dle seznamu na www.testlinecd.cz)	3,5 ml

Soupravy SmartEIA jsou koncipovány pro automatické zpracování na přístroji Agility.

IMUNOBLLOT

Kód	Název soupravy	Počet testů
HpAL20	BLOT-LINE Helicobacter IgA	20
HpGL20	BLOT-LINE Helicobacter IgG	20
Swlm03	Immunoblot Software	1 ks

MICROBLLOT-ARRAY

Kód	Název soupravy	Počet testů
HpAMA48	Microblot-Array Helicobacter IgA	48
HpGMA48	Microblot-Array Helicobacter IgG	48

STANOVENÍ UREÁZOVÉ AKTIVITY

Kód	Název soupravy	Počet testů
Ut0050	UREASAtest 50	50
Ut100	UREASAtest bulk	100



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Křižíkova 68, 612 00 Brno, Česká republika
 +420 549 121 205 (209, 238)
trade@testlinecd.com
www.testlinecd.cz



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
 je držitelem certifikátů
 ISO 9001 a ISO 13485