



ISO 9001 Certified Inc.
ISO 13485 Certified Inc.

EZ-STEP H.*Pylori* Ag ELISA

Imunoenzymatický test pro kvalitativní detekci antigenu *Helicobacter pylori* ve vzorcích stolice pro screening a sledování léčby.

OBECNÉ INFORMACE

Helicobacter pylori je spirálovitá, gram negativní tyčinka, která žije v mukózní vrstvě žaludku. Infekce *H.pylori* je považována za nejčastější příčinu gastritid a etiologicky se uplatňuje u žaludečního vředu, žaludečního adenokarcinomu a primárně u B-buněčného lymfomu.^{1,2}

Odhaduje se, že minimálně polovina světové populace je infikována touto baktérií. Infekce *H.pylori* je v typických případech získána v dětství. Jakmile je infekce získána, přetrvává chronicky a pravděpodobně zůstává v žaludku po celý život. Poškození struktur a funkce žaludku je přímé a konstantní. Přibližně jeden ze šesti případů infekce *H.pylori* vyústí v rozvoj peptického vředového onemocnění a malá část vede k rozvoji rakoviny žaludku.³

Diagnostické testy pro *H.pylori* mohou být rozděleny do dvou kategorií: Invazivní a neinvazivní testy. Přímá detekce invazivními testy vyžaduje endoskopii a biopsické vzorky ze dvou míst v žaludku.⁴ Přítomnost *H.pylori* je potom potvrzena kultivací, histologií, nebo rychlým ureasovým testem. Endoskopie a biopsické vzorky poskytují přímou detekci aktivní infekce *H.pylori*. Ačkoliv je tento postup vysoce specifický, je ale velmi nákladný a nepřijemný pro pacienty.

Pravděpodobně nejvíce dostupným neinvazivním testem je sérologický test. Sérologický test detekuje specifické protilátky IgG proti *H.pylori* u pacientů s probíhající nebo prodělanou infekcí.^{5,6} Sérologický test je jednoduchý pohodlný test s relativně vysokou citlivostí. Hlavní omezení sérologického testu je však v neschopnosti rozlišit aktivní infekci od prodělané infekce. Protilátky mohou být přítomny i po úspěšné eradikaci bakterie.⁶ Ureasový dechový test (UBT) s ¹⁴C nebo ¹³C značenou močovinou je neinvazivní test založený na detekci produkce ureázy mikroby. UBT detekuje aktivní infekci *H.pylori* a je vysoce specifický, ale vyžaduje vysokou hustotu aktivních bakterií a může být použit až po 4 týdnech pro potvrzení úspěšné eradikace, což je nutná doba pro namnožení reziduálních bakterií na zjištělné množství.⁷

EZ-STEP *H.pylori* Antigen ELISA je schopna detekovat *H.pylori* antigen ve vzorcích stolice, jehož přítomnost je důkazem aktivní infekce. Test je snadný a může být odečítán vizuálně nebo strojově.

PRINCIP TESTU

EZ-STEP *H.pylori* Antigen ELISA test využívá polyklonálních protilátek anti-*H.pylori* adsorbovaných v jamkách. Naředěný vzorek od pacienta je přidán do jamky a inkubován spolu s polyklonální protilátkou konjugovanou s peroxidázou, antigen je tak zachycen mezi fixovanou protilátkou a značeným konjugátem. Po 60 minutách inkubace při pokojové teplotě se z jamky odstraní nenavázaný vzorek a enzymem značené protilátky. Přidá se substrát a inkubuje se 10 minut při pokojové teplotě. Veškerý navázaný konjugát v jamkách konvertuje bezbarvý substrát na modré barvivo. Modré zbarvení se může odečíst vizuálně nebo spektrofotometricky se detekuje žluté zbarvení po přidání stop roztoku.

REAGENCIE

1 kit (96testů) obsahuje:

- Desku s navázanými polyklonálními anti-*H.pylori* protilátkami : 96 jamek/deska
1 jamka obsahuje
purifikované králičí anti-*H.pylori* 100 ng
fosfátový pufr (jako diluent) g. s.
- Konjugát (připravený k použití) : 1 lahvička (10 ml/ lahvička)
1 lahvička obsahuje
purifikovaný králičí anti-*H.pylori*-HRPO 10 ml
Stabilizátor: BSA g. s.

Proclin 300	0,05 v/v%
3. Pozitivní kontrola : 1 lahvička (1,5 ml/ lahvička)	
1 lahvička obsahuje	
Inaktivovaný extrakt <i>H.pylori</i>	1,5 ml
Stabilizátor : Proclin 300	0,05 v/v%
4. Negativní kontrola : 1 lahvička (1,5 ml/ lahvička)	
1 lahvička obsahuje	
10 mM fosfátový pufr (pH 7,2)	1,5 ml
Stabilizátor : Proclin 300	0,05 v/v%
5. Roztok pro ředění vzorku : 1 lahvička (40 ml/ lahvička)	
1 lahvička obsahuje	
10 mM fosfátový pufr (pH 7,2)	40 ml
Stabilizátor : Proclin 300	0,05 v/v%
6. Promývací pufr (20X koncentrovaný) : 1 lahvička (50 ml/ lahvička)	
1 lahvička obsahuje	
0,2 M fosfátový pufr (pH 6,9)	50ml
7. Substrát (připravený k použití) : 1 lahvička (10 ml/ lahvička)	
1 lahvička obsahuje	
Tetramethylbenzidine (TMB)	10ml
30% peroxid vodíku	0,02 v/v%
Citrát-fosfátový pufr (jako diluent)	g. s..
8. Stop roztok : 1 lahvička (10 ml/ lahvička)	
1,6 N kyselina sírová	10 ml
9. kapátko : 96 ea	
10. Tyčinka pro odběr vzorku : 96 ea	
11. Páska pro zakrytí desky : 2 pláty	

POUŽITÍ

EZ-STEP *H.pylori* Antigen ELISA je *in vitro* kvalitativní imunoenzymatický test (EIA) pro detekci antigenů *Helicobacter pylori* ve vzorcích lidské stolice. Výsledky testu mají pomoci při diagnóze *H.pylori* infekce, monitorovat efektivnost léčby a potvrdit eradikaci *H.pylori* u pacientů s peptickými vředy.

UPOZORNĚNÍ

- Pouze pro profesionální *in vitro* diagnostické použití.
- Vzorky ani reagencie nepipetujte ústy.
- Zabraňte kontaktu kůže se stop-roztokem (1,6 N sírová kyselina). Může způsobit podráždění a poleptání. Při potřísnění okamžitě opláchněte vodou.
- Vzorky pacientů a inaktivovaná pozitivní kontrola mohou obsahovat infekční agens a mělo by se s nimi zacházet jako s potenciálně nebezpečnými.
- Všechny reagencie je třeba před použitím jemně promíchat.
- Nezaměňujte a nemíchejte reagencie s různých šarží *H.pylori* Antigen kitů.
- Před použitím nechte reagencie zahřát na teplotu 20-30°C.
- Nepoužívejte součásti kitu po datu expirace.
- Použitý materiál uložte do odpovídající nádoby. Zacházejte s ním jako s potenciálně nebezpečným odpadem.
- Nepoužité jamky musí být okamžitě umístěny zpět do uzavíratelného obalu, aby byly chráněny proti vlhkosti.
- Jednou použité jamky nelze použít vícekrát.
- Promývání jamek je velmi důležité pro výsledek testu, **nesprávné promývání může způsobit zbarvení pozadí**, což platí pro každý imunoenzymatický test.
Všechny reagencie, vyjma promývacího pufru, jsou dodávány v pracovní koncentraci.

SKLADOVÁNÍ

Datum expirace je označeno na obalu. Skladujte reagencie při teplotě 2-8°C. Před použitím nechte reagencie ohřát na pokojovou teplotu (20-30°C) a po použití je ihned dejte zpět do prostředí s teplotou 2-8°C.

ODBĚRA ZPRACOVÁNÍ VZORKU

Vzorky stolice odeberte do nádobky, která neobsahuje médium, konzervační látky, zvířecí sérum nebo detergenty, protože by tyto látky mohly interferovat s *H.pylori* Antigen testem. Vzorky mohou být uskladněny až 3 dny při teplotě 2-8°C bez nepříznivého vlivu na výsledek testu. Pro dlouhodobé uložení vzorků se doporučuje teplota -20°C nebo nižší. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků se nedoporučuje, protože může způsobit chybný výsledek. Vzorky neskladujte v samo odmrzovacích mrazničkách.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

- Před použitím přiveďte všechny reagencie včetně jamek na pokojovou teplotu (20-30°C).

- Naředte 20× koncentrovaný promývací pufr na 1x přidáním 1 dílu koncentrátu do 19 dílů destilované nebo deionizované vody (např. 5,0 ml 20× koncentrovaného promývacího pufru + 95 ml H₂O). Naředěný promývací pufr může být skladován v čisté nádobě při pokojové teplotě (20-30°C) až tři měsíce.

■ PŘÍPRAVA VZORKU

- Do čisté zkumavky 12×75 mm dejte 400 µl roztoku pro ředění vzorku.
- Rozmíchejte velmi důkladně vzorek stolice.
- Pro tuhou nebo polotuhou stolicí – rozmíchejte stolicí odběrovou tyčinkou, tak abyste mohli přenést malý vzorek stolice (5-6 mm průměr: asi 100 mg) do roztoku pro ředění vzorku. Vzorek převedte na emulzi důkladným zvortexováním po dobu 20 sekund (dřevěnou tyčinku při tom nechte uvnitř).
- Vyhodte dřevěnou tyčinku.

■ POSTUP TESTU

- Upevněte požadovaný počet stripů do rámečku.
- Do dvou jamek nakapejte po dvou kapkách (100 µl) negativní kontroly. Do dalších dvou jamek nakapejte po dvou kapkách (100 µl) pozitivní kontroly. Do zbývajících jamek nakapejte po dvou kapkách (100 µl) vzorky pacientů přiloženým kapátkem.
* Při použití autoanalyzátoru, je dobré vzorky zcentrifugovat při 2000 ~ 3000 rpm 1 min.
- Přidejte 2 kapky (100 µl) konjugátu (#2 lahvička) do každé použité jamky a lehce poklepejte, aby došlo k promíchání a potom inkubujte při pokojové teplotě (20 ~ 30°C) 60 minut.
- 5 až 10 minut před koncem inkubace si připravte promývací roztok naředěný 1 : 20.
- Odsajte obsah ze všech jamek a každou jamku šestkrát promyjte promývacím roztokem (300 µl / jamka/jedno promytí).
- Plotnu převraťte na savý papír, aby oschla. Nakapejte po dvou kapkách (100 µl) substrátu do všech jamek a inkubujte při pokojové teplotě 10 minut. Tato reakce by měla být provedena v temnu.
- Přidejte po dvou kapkách stop-roztoku (100 µl) do každé jamky.
- Odečtěte absorbanci pozitivní a negativní kontroly a vzorku při 450 nm (referenční vlnová délka 650 nm) proti absorbanci vzduchu do uplynutí 15 minut.

■ KONTROLA KVALITY

- Průměr negativní kontroly (NC⁻, x) by měl být větší nebo roven 0,005 a menší nebo roven 0,100. Průměr pozitivní kontroly (PC⁺, x) by měl být větší než 0,500 a menší než 2,500.
- Jestliže jsou výsledky mimo uvedený interval, potom je potřeba test opakovat.

■ INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

- Při použití spektrofotometru
 - 1) Spočítejte průměr negativních kontrol (NC⁻, x) např., negativní kontrola 1 absorbance 0,045
negativní kontrola 2 absorbance 0,043
$$\frac{\text{negativní kontrola 1 absorbance } 0,045 + \text{negativní kontrola 2 absorbance } 0,043}{\text{průměr negativních kontrol (NC}^-, x) = (0,045 + 0,043) / 2 = 0,044}$$
 - 2) Výpočet hraniční hodnoty
hraniční hodnota = NC⁻, x + 0,100 = 0,044 + 0,100 = 0,144
- V případě odečítání okem.
Vzorek s absorbancí menší než má negativní kontrola je při vizuálním odečítání považován za negativní na H.pylori antigen a vzorek s absorbancí větší než má negativní kontrola je při vizuálním odečítání považován za pozitivní pro H.pylori antigen.

3. Výsledky

Vzorek s absorbancí vyšší než je hraniční hodnota je považován za pozitivní na H.pylori antigen.

* Jestliže máme vzorky s poměrem S/C v intervalu 0,9 až 1,1, opakujte test (S/C je absorbance vzorku / hraniční hodnota)

* Jestliže je vzorek považován za pozitivní na H.pylori antigen, opakujte test ve dvou jamkách a považujte jako skutečně pozitivní při pozitivitě v jedné jamce.

■ SPECIFITA TESTU

Následující bakterie a viry byly použity k otestování specifity. K pozitivním a negativním vzorkům stolice bylo přidáno >1 × 10⁸ organismů/ml a potom byly otestovány testem EZ-STEP H.pylori Antigen ELISA. H.pylori pozitivní stolice zůstala pozitivní i po přidání mikrobu. Negativní stolice zůstala negativní s přidávanými mikroby.

- bakterie a viry použité k otestování specifity

<i>Adenovirus type II</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Escherichia hermannii</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Helicobactermustelae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Rotavirus</i>
<i>Salmonella (Group B)</i>	<i>Salmonella dublin</i>
<i>Salmonella hilversum (Group N)</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Salmonella minnesota</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus (Cowan)</i>
<i>Staphylococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus galactiae</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

■ LITERATURA

- Marshall, B.J. and Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet* 1:1984; 1311-1314.
- Graham K.S and Graham D.Y. 1999. Contemporary Diagnosis and Management of H.pylori – Associated Gastrointestinal Diseases, Handbooks in health Care Co., Newtown, PA., 1999; 39-67.
- Howden C.W. Clinical expressions of Helicobacter pylori infection. *Am J Med*: 1996; 100: 27S-33S
- El-Zimaity HM, Al-Assi MT, Genta RM, Graham DY. Confirmation of successful therapy of Helicobacter pylori infection: number and site of biopsies or a rapid urease test. *Am J Gastroenterol*. 1995; 90:1962-1964.
- Talley NJ, Newell DG, Ormand JE, et al. Serodiagnosis of Helicobacter pylori: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin Microbiol*. 1991; 29:1635-1639.
- Cutler AF. Testing for Helicobacter pylori in clinical practice. *Am J Med*. 1996; 100:35S-41S.
- Klein PD, Malaty HM, Martin RF, et al. Noninvasive detection of Helicobacter pylori infection in clinical practice: the 13C urea breath test. *Am J Gastroenterol*. 1996; 91:690-694.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control: Principles and definitions; Approval Guideline, NCCLS document C24-A (NCCLS, 711 East Lancaster Ave, Vallanova, PA 19085, 1991).
- Marshall BJ. *JAMA*. 1995;274:1064-1066.
- Breuer T, Malaty HM, Graham DY. The epidemiology of H.pylori – associated gastroduodenal diseases. In: Ernst PB, Michetti P, Smith PD, eds. The Immunobiology of H.pylori: From Pathogenesis to Prevention. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1997; 1-14.
- Graham DY, Malaty HM, Evans, Jr. DJ, Klein PD, and adam E. Epidemiology of Helicobacter pylori in a symptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology*, 1991; 100:1495-1501.
- Anand BS, Raed AK, Malaty HM, et al. Loe point prevalence of peptic ulcer in normal individual with Helicobacter pylori infection. *AM J Gastroenterol*. 1996;91:1112-1115.
- Tytgat GNJ, Noach LA, Rauws EAJ. Helicobacter pylori infection and duodenal ulcer disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 1993;22:27-139.



www.dinona-inc.com

41-2140PI-9PI-0

Date Issued : 2004.11.11



Storage : 2-8°C

Exp : 18 měsíců od data výroby

Manufactured by : DINONA
203-7 Byungjeom-Ri, Taean-Eup, Hwasung-Si,
Kyunggi-Do, Korea
TEL : +82-31-232-0168 Fax : +82-31-232-0603

	Výhradní distribuce: EXBIO Olomouc s.r.o. Ovesná 14, 77900 Olomouc Tel.: 585 415 701-2 Fax: 585 414 358 e-mail: info@exbio.com www.exbio.com

EC	REP	PREMIER TECHNOLOGY Dorfstrasse 127a D-17375 Leopoldshagen, Germany Tel.: +49 39774 29569
----	-----	---