



CoproELISA™ *H. pylori*

Test immunoenzymatyczny (ELISA)
do wykrywania antygenów *Helicobacter pylori* w
ludzkim kale

Instrukcja obsługi

Zestaw testowy do 96 oznaczeń
Numer katalogowy: 774-01

Do diagnostyki *in vitro*
Przechowywać w temperaturze 2-8°C. **Nie
zamrażać**



Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 7761003
IZRAEL
Nr tel. +972.8.8562920
Faks: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnosics.com

Przeznaczenie

CoproELISA™ *H. pylori* to test immunoenzymatyczny (ELISA) firmy Savyon do stosowania jako badanie przesiewowe i wykrywające *Helicobacter pylori* w kale ludzkim pacjentów z podejrzeniem zakażenia.

Do diagnostyki *in-vitro*

Wstęp

Helicobacter pylori (*H. pylori*) to gram-ujemna, mikroaerofilna bakteria występująca jedynie w żołądku i dwunastnicy. Została zidentyfikowana w 1982 roku przez australijskich naukowców Barry'ego Marshalla i Robina Warrena, którzy wykryli jej obecność u pacjentów z przewlekłym zapaleniem błony żołądka i wrzodami żołądka - schorzeniami, których nie uznawano wcześniej za choroby o podłożu mikrobiologicznym. *H. pylori* została również zidentyfikowana jako czynnik etiologiczny w rozwoju wrzodów dwunastnicy i raka żołądka. Ponad pięćdziesiąt procent światowej populacji jest nosicielem bakterii *H. pylori* w górnym odcinku przewodu pokarmowego, jednak ponad 80 procent osób zakażonych tą bakterią jest bezobjawowa i postuluje się, że być może odgrywa ona ważną rolę w gospodarce naturalnej żołądka¹.

H. pylori jest bakterią zakaźną, chociaż dokładna droga przenoszenia nie jest znana^{2,3}. Transfer między ludźmi odbywa się najczęściej drogą oralno-oralną lub fekalno-

oralną. Zgodnie z tymi drogami przenoszenia bakterie zostały wyizolowane z kału, śliny i płytki nazębnej niektórych zakażonych pacjentów. W krajach rozwiniętych przenoszenie odbywa się głównie w rodzinach, natomiast w krajach rozwijających się bakterię można nabyć również od społeczności⁴.

Objawy przedmiotowe i podmiotowe: Ponad 80% osób zakażonych *H. pylori* nigdy nie doświadcza objawów ani powikłań⁵. Ostra infekcja może pojawić się jako ostre zapalenie błony żołądka z bólem brzucha (bólem żołądka) lub nudnościami⁶. W przypadku wystąpienia przewlekłego zapalenia żołądka, objawy, jeżeli występują, to często niestrawność niwrzodowa: bóle brzucha, nudności, wzdęcia, odbijanie i czasami wymioty lub czarne stolce^{6,7}.

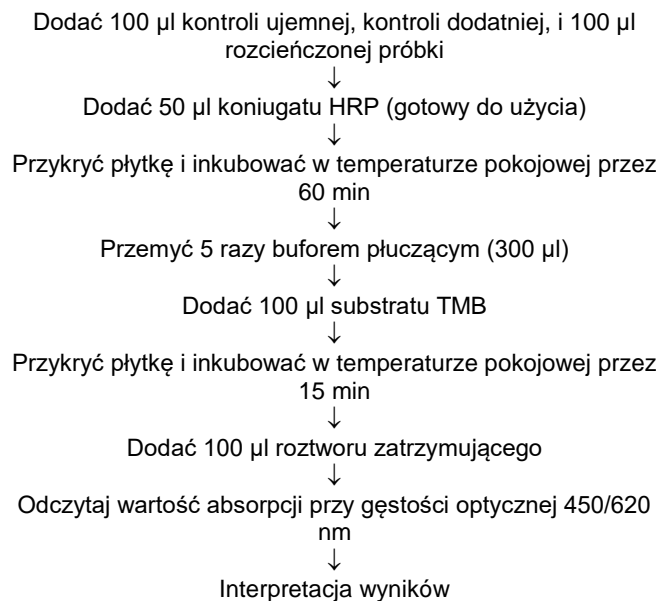
Diagnoza: Badanie na *H. pylori* jest zalecane w przypadku podejrzenia choroby wrzodowej, chłoniaka żołądka typu MALT o małej złośliwości, po endoskopowej resekcji raka żołądka we wczesnym stadium, jeżeli ktoś posiada krewnych pierwszego stopnia chorych na raka żołądka i -czasami, w pewnych przypadkach - niestrawności. Laboratoryjne testy diagnostyczne *H. pylori* można podzielić na inwazyjne (kontrolna biopsja podczas endoskopii badana mikroskopowo i hodowana na posiew), lub nieinwazyjne, takie jak test na obecność przeciwciał we krwi, test na obecność antygenów w kale, lub ureazowy test oddechowy (UBT) który polega na spożyciu przez pacjenta izotopowo oznaczonego mocznika⁸. Żadna z metod badawczych nie jest całkowicie niezawodna. Nawet biopsja jest zależna od lokalizacji. Samo badanie jest obciążone ryzykiem i powoduje uczucie dyskomfort u pacjenta. Ponadto bakterie skolonizowane miejscowo mogą zostać pominięte podczas biopsji. Ostatni Raport Uzgodnieniowy Maastricht 2-2000 zaleca stosowanie testów antygenowych kału i ureazowych testów oddechowych jako pomocy w diagnostyce choroby *H. pylori* w warunkach podstawowej opieki zdrowotnej⁹.

CoproELISA™ *H. pylori* to test immunologiczny z mikrostudzienkami wykorzystujący enzymy do wykrywania antygenów *Helicobacter pylori* obecnych w kale ludzkim.

Zasada testu

- Rozdzielane mikrostudzienki są pokryte przeciwciałem monoklonalnym wykrywającym *H. pylori*.
- Próbkę pacjentów rozcieńcza się w rozcieńczalniku kału *H. pylori* i dodaje do mikrostudzienek.
- Przeciwciała monoklonalne koniugujące z peroksydazą chrzanową (HRP) jest dodawane do mikrostudzienek i inkubowane przez 60 minut w temperaturze pokojowej.
- Niezwiązany koniugat usuwamy płuczając.
- Dodawany jest substrat TMB; substrat jest hydrolizowany przez peroksydazę i ze zredukowanego substratu tworzy się niebieski roztwór.
- Po dodaniu roztworu zatrzymującego, niebieski kolor zmienia się w żółty i należy wówczas sprawdzić wynik za pomocą czytnika ELISA o długości fali 450/620 nm.

Podsumowanie procedury ręcznej



Zawartość zestawu do 96 oznaczeń

- Płytką do mikromiareczkowania pokrytą przeciwciałem monoklonalnym wykrywającym *H. pylori* wyłapuje antygeny:** 96 oddzielanych studzienek (8x12) pokrytych przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla *H. pylori*, zapakowane w aluminiową saszetkę zawierającą kartę ze środkiem osuszającym. **1 płytką**
- Stężony bufor płuczający (20x):** Bufor PBS-Tween **1 buteleczka, 100 ml**
- Rozcieńczacz kału *H. pylori*:** Gotowy do użycia roztwór buforowy zawiera mniej niż 0,05% substancji ProClin pełniącej funkcję środka konserwującego. Rozcieńczacz jest również stosowany jako roztwór do kontroli ujemnej (patrz PROCEDURA TESTOWA) **2 buteleczki, 50 ml**
- Koniugat HRP (zielony):** Gotowy do użycia roztwór zawierający perooksydazę chrzanową (HRP) koniugującą z przeciwciałami monoklonalnymi *H. pylori* zawiera mniej niż 0,05% konserwującej substancji ProClin. **1 buteleczka, 7 ml**
- Kontrola pozytywna (czerwony):** Gotowy do użycia roztwór zawierający nieaktywne komórki *H. pylori*, zawiera mniej niż 0,05% konserwującej substancji ProClin. **1 fiolka, 2,5 ml**
- Substrat TMB:** Gotowy do użycia roztwór zawierający 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę jako chromogen i nadtlenek jako substrat. **1 buteleczka, 16 ml**
- Roztwór zatrzymujący:** Roztwór gotowy do użycia. Zawiera 1M H₂SO₄. **1 buteleczka, 16 ml**
- Jednorazowe plastikowe pipety:** **100 szt.**
- Szalka:** **1 szt.**
- Instrukcja obsługi** na stronie: www.sayvondiagnosics.com/downloads

Materiały wymagane, ale niedostarczane

- Czyste próbówki do rozpuszczania kału pacjentów.

- Regulowane mikropipety lub pipety wielokanałowe (zakresy 50-200 i 200-1000µl) i końcówki jednorazowe.
- Jednorazowe plastikowe/drewniane kolektory lub łyżeczki.
- Kolba miarowa o pojemności 1 litra.
- Jeden cylinder miarowy o pojemności 50 ml.
- Tryskawka.
- Papier absorpcyjny.
- Vorteks.
- Czytnik ELISA wyposażony w filtry 450/620 nm.
- Woda destylowana lub podwójnie demineralizowana.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Przed użyciem odczynnik należy doprowadzić do temperatury pokojowej.
- Podczas pracy ze studzienkami testowymi należy unikać zarysowania dna studzienki, ponieważ może to prowadzić do podwyższonych odczytów absorpcji.
- Z próbkami kału, studzienkami do mikrotestów, końcówkami do mikropipet, pojemnikami na kał i próbkami należy obchodzić się jak z materiałami potencjalnie biologicznie niebezpiecznymi, więc jako takie należy je po użyciu odpowiednio zutylizować. Podczas wykonywania testu noś rękawiczki.
- Aby chronić nieużywane studzienki do mikrotestów przed wilgocią, należy je ponownie umieścić w zamkniętej saszetce ze środkiem osuszającym.**
- Roztwór substratu TMB jest środkiem drażniącym skórę i błony śluzowe. Unikać bezpośredniego kontaktu.
- Rozcieńczony kwas siarkowy (1M H₂SO₄) jest środkiem drażniącym dla oczu i skóry. W przypadku kontaktu z oczami natychmiast przepłukać obszar wodą i skonsultować się z lekarzem).

Przechowywanie i okres przydatności odczynników

- Data ważności zestawu znajduje się na etykiecie. Daty ważności każdego komponentu są wymienione na poszczególnych etykietach. Zestaw należy przechowywać w temperaturze od 2° do 8°C i jak najszybciej po użyciu odłożyć do lodówki. Ekspozycja oryginalnie zamkniętych lub zapieczętowanych komponentów na działanie temperatury otoczenia przez kilka godzin nie spowoduje uszkodzenia odczynników. **NIE ZAMRAŻAĆ!**
- Nieużywane paski należy ponownie umieścić w aluminiowej saszetce z kartą ze środkiem osuszającym, przeciągając otwarty koniec i mocno uszczelniając taśmę na całej długości otworu.

Pobieranie kału

- Zastosowanie mają standardowe procedury pobierania i przenoszenia próbek kału oraz hodowania posiewu, znane z testów do użytku domowego.
- Zakonserwowany kał: **test nie został zatwierdzony do użytku z próbkami po konserwacji.** (np. w 10%

formalinie, formalinie z octanem sodu (SAF), lub alkoholu poliwinylowym (PVA)).

3. Próbkę należy przechowywać w temperaturze od 2° do 8°C i zbadać w ciągu 48 godzin od pobrania. Jeżeli badania nie można przeprowadzić w ciągu 48 godzin, próbki należy przechowywać w temperaturze -20°C lub niższej.
4. Ograniczyć zamrażanie i rozmrażanie próbek, gdyż może to spowodować degradację/proteolizę antygenu i spowodować utratę aktywności.

Procedura testowa do użytku ręcznego

A. Przygotowanie odczynników

1. Doprowadzić wszystkie składniki i próbki kliniczne do temperatury pokojowej. Określić całkowitą liczbę badanych próbek. Oprócz próbek do każdego badania należy użyć: jednej studzienki do kontroli ujemnej (w tym celu należy użyć rozcieńczacza kału) i jednej studzienki do kontroli dodatniej
2. Wyjąć płytkę do mikromiareczkowania z aluminiowej saszetki, odcinając jeden koniec w pobliżu uszczelki. Pozostawić wymaganą liczbę pasków (w zależności od liczby badanych próbek) w 96-studzienkowej ramce.
3. Rozcieńczyć stężony bufor płuczący w stosunku 1/20 wodą podwójnie demineralizowaną lub destylowaną. Na przykład: aby przygotować jeden litr buforu płuczającego, należy dodać 50 ml stężonego buforu płuczającego do 950 ml wody podwójnie demineralizowanej lub destylowanej.

B. Przetwarzanie próbek

4. Dla każdej badanej próbki należy przygotować jedną próbkę do rozcieńczania. Do tego celu zaleca się stosowanie probówek Eppendorfa o poj. 1,5 ml. Do każdej próbki dodać 500 µl rozcieńczacza kału H. pylori. Podpisać próbkę.
5. **Stale próbki:** Za pomocą drewnianego patyczka lub jednorazowej łyżeczki przenieść próbkę kału do próbki. Przenieść ok. 0,1 do 0,15 g próbki (ilość odpowiadająca rozmiarowi małego ziarnka grochu) do rozcieńczacza kału H. pylori. Mieszać kolektorem w rozcieńczaczu kału, aby usunąć jak najwięcej próbek i przycisnąć kolektor do ścianki próbki w celu odciśnięcia pozostałego płynu.
Płynne próbki: przenieść 100 µl próbki do próbki. Upewnić się, że z płynnej próbki otrzymamy równomierną zawiesinę.
6. **Dokładnie wymieszać próbkę kału (za pomocą wrotka) przez 15 sekund, aby zapewnić jej odpowiednie przygotowanie.** Pozostawić próbkę na co najmniej 10 minut. Próbkę kału mogą zostać odwirowane po rozcieńczeniu, jeżeli jest to wymagane. Próbkę należy odwirowywać przez 30 s. przy 1000 g. Sprawdzić, czy utworzony supernatant nie zawiera dużych cząstek stałych.
7. Przechowywać rozcieńczone próbki w temperaturze od 2° do 8° C, aż do przeprowadzenia testu.

C. Inkubacja próbek kału i kontroli

8. Odmierzyć za pomocą pipety 100 µl kontroli dodatniej i kontroli ujemnej (tj. rozcieńczacza kału H. pylori) do oddzielnych studzienek paska testowego.
9. Nanieść 100 µl rozcieńczonej próbki kału do osobnych studzienek paska testowego przy użyciu dostarczonych pipet jednorazowego użytku (najniższy znacznik na pipecie).
10. Do każdej studzienki nanieść 50 µl gotowego do użycia koniugatu.
11. Przykryć paski przykrywką, delikatnie wstrząsnąć mikroplótką przez 20 sekund, aby zapewnić jednorodną wymieszanie koniugatu z próbką (w tym celu można użyć wytrząsarki do płytek) Poddawać inkubacji w temperaturze pokojowej przez 60 min.
12. **Etap płukania:** Wylać płynną zawartość studzienek. Napełnić każdą studzienkę buforem płuczającym, aż po sam brzeg studzienki (300 µl). Powtórzyć ten krok 4 razy, aż do uzyskania łącznie **PIĘCIU powtórzeń**. Można użyć do tego celu automatycznego sprzętu do mycia.
13. Osuszyć paski i ramkę delikatnie obstukując je na papierze absorpcyjnym.

D. Inkubacja z substratem TMB

14. Nanieść 100 µl substratu TMB do każdej studzienki, zakryć paski pokrywką i pozostawić do inkubacji w temperaturze pokojowej przez **15 minut**.
15. Zatrzymać reakcję dodając 100 µl roztworu zatrzymującego (1M H₂SO₄) do każdej studzienki.

E. Odczytywanie wyników

16. Określić wartość absorbancji przy 450/620 nm i zapisać wyniki. Odczytywanie wyniku powinno zostać wykonane nie później niż 10 minut po zatrzymaniu reakcji chromogenicznej.

Uwaga: Przed odczytem należy usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza. Spód płytki ELISA powinien zostać starannie wytarty.

Procedura testowa do użytku automatycznego

A. Przygotowanie odczynników

1. Doprowadzić wszystkie składniki i próbki kliniczne do temperatury pokojowej. Określić całkowitą liczbę badanych próbek. Oprócz próbek do każdego badania należy użyć: jednej studzienki do kontroli ujemnej (w tym celu należy użyć rozcieńczacza kału) i jednej studzienki do kontroli dodatniej
2. Wyjąć płytkę do mikromiareczkowania z aluminiowej saszetki, odcinając jeden koniec w pobliżu uszczelki. Pozostawić wymaganą liczbę pasków (w zależności od liczby badanych próbek) w 96-studzienkowej ramce.
3. Rozcieńczyć stężony bufor płuczający w stosunku 1/20 wodą podwójnie demineralizowaną lub destylowaną. Na przykład: aby przygotować jeden litr buforu płuczającego, należy dodać 50 ml stężonego buforu płuczającego do

950 ml wody podwójnie demineralizowanej lub destylowanej.

B. Przetwarzanie próbek

- Przygotować jedną probówkę do rozcieńczania dla każdej badanej próbki (użyć probówek zgodnych z dostępnym sprzętem automatycznym). Dodać 1000 µL rozcieńczacza kału *H. pylori* do każdej próbki z próbką. Podpisać probówkę.
- Stale próbki:** Za pomocą drewnianego kolektora lub jednorazowej łyżeczki dodać próbkę kału do próbki. Przenieść ok. 0,2, do 0,3 g próbki (ilość odpowiadająca rozmiarowi dwóch małych ziarenek grochu) do odpowiedniej próbki. Pomieszać kolektorem w rozcieńczaczu kału *H. Pylori*, aby usunąć jak najwięcej próbki i przycisnąć kolektor do ścianki próbki w celu odciśnięcia pozostałego płynu.
Płynne próbki: przenieść 300 µL próbki do próbki. Upewnić się, że z płynnej próbki otrzymamy równomierną zawiesinę.
- Dokładnie wymieszać próbkę kału (za pomocą wortexu), aby zapewnić jej odpowiednie przygotowanie.**
- Pozostawić probówkę na co najmniej 10 minut, aż do wytrącenia się dużych cząstek stałych (dekantacja). Sprawdzić, czy utworzony supernatant nie zawiera dużych cząstek stałych. Próbkę należy odwirowywać przez 30 sek przy 1000 g, jeżeli to konieczne.
- Przenieść próbki z próbkami do odpowiednich stojaków w maszynie automatycznej.

C. Inkubacja próbek kału i kontroli z koniugatem

- Odmierzyć za pomocą pipety 100µl kontroli dodatniej i 100µl kontroli ujemnej (tj. rozcieńczacza kału *H. pylori*) do oddzielnych studzienek paska testowego.
- Nanieść 100µl rozcieńczonej próbki kału na pasek testowy. Każda próbka do innej studzienki.
- Nanieść 50µl gotowego do użycia koniugatu do każdej studzienki, delikatnie potrząsać mikroplytką przez 10 sek.
- Poddać płytkę inkubacji w temperaturze pokojowej przez **60 minut**.
- Wykonać 5 X 350µl cykli płukania używając wstępnie rozcieńczonego bufora płuczającego.
- Wykonać 2 cykle pobierania z zassaniem rozmazu.

D. Inkubacja z substratem TMB

- Nanieść 100µl substratu TMB do każdej studzienki. Poddać inkubacji w temperaturze pokojowej przez 15 minut.
- Zatrzymać reakcję dodając 100µl roztworu zatrzymującego (1M H₂SO₄) do każdej studzienki.

E. Odczytywanie wyników

- Określić wartość absorbancji przy 450/620 nm i zapisać wyniki.

Należy pamiętać, że każda automatyczna maszyna ma określone polecenia techniczne. Proszę wdrożyć dla tego

zestawu w protokole działania zautomatyzowanego sprzętu procedurę automatyzacji firmy Savyon.

Walidacja badań

Aby test był ważny, muszą zostać spełnione poniższe kryteria. Jeżeli kryteria te nie są spełnione, badanie należy uznać za nieważne i je powtórzyć.

Kontrole ujemne (NC):

Wartość absorbancji powinna wynosić < 0,15 przy 450/620 nm.

Kontrole dodatnie (PC):

Wartość absorbancji powinna wynosić ≥ 0,8 przy 450/620 nm.

Interpretacja wyników

Spektrofotometryczna podwójna długość fali przy 450/620 nm

Negatywny: Gęstość optyczna próbki < 0,150

Pozytywny: Gęstość optyczna próbki ≥ 0,150

Ograniczenia testu

- Test CoproELISA™ *H. pylori* wykrywa obecność antygenu *H. pylori* w próbce kału. Przed podaniem ostatecznej diagnozy lekarz powinien uwzględnić wykrycie antygenu w kale w świetle historii klinicznej pacjenta i jego wyników. Niemożność wykrycia antygenu *H. Pylori* w próbce kału pacjenta nie może wykluczać rzeczywistej choroby, ale może być spowodowana innymi czynnikami, takimi jak nieprawidłowe obchodzenie się z próbkami lub przechowywanie stolca. Możliwe jest również, że poziom *H. Pylori* jest poniżej wykrywalnego przez ten konkretny zestaw testowy.
- Test jest jakościowy, zatem nie należy dokonywać interpretacji ilościowych w odniesieniu do wartości.
- Stabilność *H. pylori* w próbkach kału może zostać zaburzona. Zatem ważne jest, by przechowywać próbki w temperaturze 2-8° C zaraz po pobraniu. Próbki, które nie zostały poddane analizie w ciągu 48 godzin mogą zostać zamrożone i rozmrożone.
- Niektóre próbki mogą dawać niski poziom wykrywalności. Przyczyn może być wiele, jak np. niski poziom obecności bakterii lub obecność określonych czynników w kale, zakłócających wykrywalność immunologiczną testu. W takiej sytuacji zaleca się ponowne zbadanie próbek przy użyciu świeżego materiału.

Charakterystyka działania testu

Ocena kliniczna przeprowadzona z użyciem testu CoproELISA™ *H. pylori* wykazała, że test ELISA może w sposób rzetelny i przewidywalny wykrywać antygen *H. pylori* w kale ludzkim u pacjentów z objawami.

Łącznie 145 próbek kału zostało przebadanych klinicznie za pomocą testu CoproELISA™ *H. pylori*, i porównanych z wynikami komercyjnego zestawu referencyjnego ELISA zatwierdzonego przez FDA.

Tabla 1:

		Zestaw referencyjny ELISA*		
		pozytywny	negatywny	ogółem
CoproELISA™ <i>H. pylori</i>	pozytywny	91	2	93
	negatywny	4	48	52
	ogółem	95	50	145

* Zestaw ELISA zatwierdzony przez FDA / CE

Czułość: 96 %, Specyficzność : 96 %

PPV: 98%, NPV: 92%

Reakcyjność krzyżowa i zakłócenia w infekcjach mieszanych

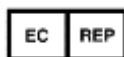
Test CoproELISA™ *H. pylori* oceniano przy użyciu klinicznych próbek kału określonych jako dodatnie dla różnych patogenów żołądkowo-jelitowych. Brak krzyżowej reaktywności interferencji przez infekcje mieszane z którymkolwiek z wymienionych poniżej patogenów żołądkowo-jelitowych:

Salmonella spp., *Campylobacter*, *Shigella*, *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica* oraz *Clostridium difficile*

Bibliografia

- Blaser M. J. (2006). "Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases". *EMBO Reports* 7(10): 956–60.
- Mégraud F. (1995). "Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route". *Aliment Pharmacol Ther* 9(2):85–91.
- Cave D. R. (1996). "Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*". *Am J Med* 100(5A):12–17; discussion 17–18.
- Delpont W. van der Merwe S. W. (2007). "The transmission of *Helicobacter pylori*: the effects of analysis method and study population on inference". *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 21(2):215–36.
- Bytzer P. Dahlerup J. F. Eriksen J. R. Jarbøl D. E. Rosenstock S. Wildt S. (2011). "Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection". *Dan Med Bull* 58(4): C4271.
- Butcher, Graham P. (2003). *Gastroenterology: An Illustrated Colour Text*. Elsevier Health Sciences. p. 5-25.
- Ryan K. (2010). *Sherris Medical Microbiology*. McGraw-Hill. pp.573, 576.
- Stenström B. Mendis A. Marshall B. (2008). "*Helicobacter pylori*-The latest in diagnosis and treatment". *Aust Fam Physician* 37(8):608–12.
- Malfertheiner P. Megraud F. Morain O. (2002). "Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection" - The Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 16:167-80.

CE



Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej: Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels

Tel.: +32.2.732.59.54 Faks: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

Symbole elementów i odczynników do diagnostyki in vitro (IVD)			
	Producent		Wyłącznie do diagnostyki in vitro.
	Upoważniony przedstawiciel:		Przeczytać instrukcję stosowania
	Zawartość wystarczająca do przeprowadzenia <n> testów		Przechowywać w suchym miejscu.
	Kod katalogowy		Ograniczenie temperatury
	Numer partii		Data ważności
	Rozcieńczalnik do próbek		