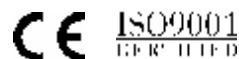


Diarlex®MB

Kat.č.67141

Návod k použití



1. Určený účel použití a indikace k použití

Diarlex MB je specifický kvalitativní test pro detekci rotaviru a adenoviru ve vzorcích stolice u pacientů s akutní gastroenteritidou.

Pro diagnostické použití *in vitro*

2. Klinický význam

Rotavirus je nejčastější kauzativní agens u virových gastroenteritid, zejména u dětí¹. Rotavirová diarrhoea může být vážná, ústící v dehydrataci a v porušení rovnováhy tělních elektrolytů. Diagnóza rotavirové gastroenteritidy je založena na přítomnosti rotavirových částic ve stolici. Vylučovány ve velkém množství mohou být rotavirové částice zjištěny elektronovou mikroskopií nebo detekovány imunologickými metodami.

Adenovirus je druhým nejčastěji detekovaným virovým agens gastroenteritid v dětském věku². Některé adenovirové serotypy byly odhaleny jako respirační a oční patogeny³. Je známo 41 serotypů adenovirů. Adenoviry serotypu 1-39 jsou nejčastěji přenášeny přes respirační a oční sekreci, zatímco serotypy 40 a 41 jsou přenášeny cestou fekálně-orální a jsou spojeny s gastroenteritidou⁴. Při vylučování nekultivovatelných adenovirových částic stolicí ve spojitosti s průjmem je vysoce pravděpodobné, že jde o adenovirovou gastritidu⁵.

Adenovirové a rotavirové částice mohou být sledovány v elektronovém mikroskopu nebo detekovány imunologickými metodami. V současné době mezi dostupné imunologické metody patří latexová aglutinace, imunochromatografické testy a enzymoimunoanalýza.

3. Princip testu

Diarlex MB je imunochromatografický test. Dvě kapky zředěného vzorku se nadávkují do zóny pro vzorek na testovacím proužku. Jestliže vzorek obsahuje rotavirus, vytvoří se komplex antigen-protilátka s rotavirovou králičí protilátkou konjugovanou **červeným** latexem. Jestliže vzorek obsahuje adenovirus, vytvoří se komplex antigen-protilátka s adenovirovou králičí protilátkou konjugovanou **modrým** latexem. Imunokomplexy migrují po testovací membráně a váží se na imobilizovanou rotavirovou nebo adenovirovou protilátku za vzniku buď červené nebo modré linky ve výsledkové zóně. V průběhu testu se objeví černá kontrolní linka obsahující myší monoklonální protilátky, černé latexové částice a streptavidin, což deklaruje, že test pracuje správně.

4. Reagencie

Obsah kitu Diarlex MB, kat.č. 67141

Testovací proužky v hliníkové tubě	20 ks
Opěrné destičky	20 ks
Roztok pufru	90 ml
Adeno pozitivní kontrola	0,5 ml
Rota pozitivní kontrola	0,5 ml
Návod k použití	1 ks
Reagencie obsahují azid sodný, čtěte proto „Upozornění a varování“.	

5. Potřebné materiály nedodávané se soupravou

- Odběrové lahvičky (Faecal Specimen Filtration Vials), kat. č. 68312
nebo
- Zkumavky pro zředění vzorků stolice
- Vibrační míchadlo
- Centrifuga
- Pipety

6. Upozornění a varování

Varování s ohledem na zdraví a bezpečnost

- **Pro diagnostické použití *in vitro***
- Reagencie obsahují < 0,1% azidu sodného jako konzervační činidlo. Azid sodný uvolňuje toxický plyn, pokud je v kontaktu s kyselinami. Azidy mohou reagovat s kovovými uzávěry za tvorby explozivních látek. Tvorbě azidů lze předejít tím, že při likvidaci reagensů opláchnete materiály velkým množstvím vody.
- Nepijte roztok ve filtrační nádobě, ani v lahvičce s pufrem .
- Nekuřte, nejezte, ani nepijte v místech, kde pracujete se vzorky nebo reagensy.
- Se všemi vzorky pacientů zacházejte jako s materiály schopnými přenášet infekční agens.
- Při práci se vzorky a testem používejte ochranné rukavice a po práci si důkladně umyjte ruce.
- Ačkoliv materiály neobsahují rotavirové nebo adenovirové infekční agens, jsou lidského původu, proto je třeba s nimi zacházet a je likvidovat jako materiály s potenciálním biologickým rizikem.
- Ukápnutý potenciálně infekční materiál je nutno okamžitě utřít buničitou vatou a kontaminovaná místa okamžitě otřít standardním dezinfekčním prostředkem nebo 70% ethylalkoholem. Použité materiály pro čištění, včetně rukavic, umístěte do sběrné nádoby pro biologicky nebezpečný odpad.
- Likvidace: viz.kapitola 15 „Doporučení pro likvidaci“.

Analytická varování

- Signifikantnost výsledku je třeba hodnotit v souvislosti s klinickými symptomy pacienta.
- Nepoužívejte reagencie po indikované expirační době.
- Nemíchejte reagencie z kitů různých šarží.
- Nepoužívejte zředěné vzorky, které nebyly připraveny podle těchto návodu. Používejte pouze vzorky stolice.
- Kontejner s nepoužitými proužky je vždy nutné pečlivě uzavřít okamžitě po vyndání požadovaného počtu proužků.
- Nepoužívejte proužky, na kterých se objevila červená nebo modrá linka ve výsledkové zóně dříve, než jste začali provádět test.
- Nesahejte na membránovou oblast proužku, mohlo by to mít vliv na reakci.
- Nápadná turbidita jakékoli z pozitivních kontrol může být známka kontaminace reagensů. Nepoužívejte kit, pokud kontroly nepracují, jak očekáváte.

7. Skladování a expirační doba

Uchovávejte při teplotě 2...8°C. Před použitím vytemperujte reagencie na laboratorní teplotu (18...25°C). Expirační doba je vytištěna na krabičce kitu. Testovací tyčinky nepoužívejte po expiračním datu

Poznámka! Kontejner s nepoužitými proužky je vždy nutné pečlivě uzavřít okamžitě po vyndání požadovaného počtu proužků. Jestliže proužky uchováváte v suchu, můžete je používat po dobu **4 měsíců** po prvním otevření kontejneru, nejvýše však do expirační doby.

8. Odběr vzorku a manipulace s ním

Testovány mohou být jak vzorky pevné, tak řídké stolice odebrané do čistých plastických kontejnerů nebo vzorky získané z potřísněných plenek. S testem mohou interferovat konzervanty, vysoké koncentrace detergentů nebo suspenze stolice s médii obsahujícími séra, proto by neměly být používány. Používejte pouze pufr dodávaný s produkty Diarlex nebo Rotalex/Adenolex anebo filtrační odběrové lahvičky (Faecal Specimen Filtration Vials).

Mekonium nesmí být použito jako vzorek.

Doporučujeme vzorky stolice ředit pufrům a okamžitě analyzovat.

Je-li to nezbytné, lze stolicu před analýzou několik dní při 2...8°C. Neředěné vzorky stolice lze skladovat při teplotě -18° C a nižší po dobu několika měsíců. Vzorek opakovaně nerozmrazujte a nemražte, ani pro skladování nepoužívejte auto-rozmrazovací mrazničky, mohlo by to způsobit chybné výsledky.

Optimální doba pro testování rotavirové infekce leží v době prvních 3-5 dní po nástupu symptomů¹. Doporučujeme odebrat vzorek kdykoli během této doby. Vzorek odebraný 8 a více dní po začátku symptomů rotavirové infekce by již nemusel obsahovat dostatečný počet rotavirových částic k tomu, aby reakce s testem Diarlex byla pozitivní.

Vzorek můžeme připravovat jak filtrační metodou (8.1), tak metodou centrifugační (8.2).

8.1. Metoda s použitím filtračních lahviček pro odběr vzorku stolice (Obr./Fig. 1 – 2)

1. Vytemperujte vzorek i filtrační lahvičky na laboratorní teplotu (18...25°C).
2. Na každou lahvičku nalepte štítek s identifikačními daty pacienta.
3. Otevřete víčko a odeberte vzorek stolice ve velikosti 2 plných lžiček (~ 1 ml) lžičkou připevněnou ve víčku lahvičky. Vzorek odeberete do lahvičky, kterou pečlivě uzavřete.
4. Lahvičku promíchejte, aby se vzorek v pufru dobře rozmíchal. Nepoužívejte vibrační míchadlo.

Ředěné vzorky lze uchovávat 10 dní při 2...8°C. Ředěné vzorky nesmí být zmrazeny.

8.2. Centrifugační metoda

1. Nařed'te vzorky stolice 1:10 (1+9, tj. 0,5 ml + 4,5 ml) s roztokem Diarlex pufru ve zkumavce.
2. Důkladně promíchejte ručně nebo na vibračním míchadle.
3. Centrifugujte 10 minut, přibližně 1000 x g (tj. přibl.3000 rpm).

Supernatant lze skladovat 10 dní při teplotě 2...8°C. Testujte pouze čistý supernatant.

9. Pracovní postup

Před použitím vytemperujte ředěný vzorek a testovací kit na laboratorní teplotu (18...25°C).

9.1. Pracovní postup pro test

1. A) Filtrační metoda

Důkladně promíchejte obsah filtrační nádoby. Odstraňte klobouček ze špičky víčka. Lahvičku obraťte dnem vzhůru a odkápněte prvních 5 kapek mimo test (Obr./Fig.3).

B) Centrifugační metoda

Jako vzorek použijte čistý supernatant.

2. Držte testovací proužek za barevný konec a umístěte jej do držáku proužků. Upevníte jej zatlačením mezi šipky (Obr./Fig.4). Nedotýkejte se membránové oblasti proužku.
3. Kápněte dvě kapky filtrátu nebo supernatantu (2 x 50 µl) na proužek do zóny pro vzorek (Obr./Fig. 5). Je důležité nechat první kapku absorbovat do membrány než se přidá druhá kapka.
4. Výsledky interpretujte do 10 minut po přidání vzorku.
Obrázky viz. originální příbalová informace.

9.2. Interpretace výsledků

Signifikance výsledků testu by měla být hodnocena ve spojitosti s klinickými symptomy pacienta.

Pozitivní výsledek (Obr./Fig.6)

Test je pozitivní na rotavirus, jestliže se do 10 minut, spolu s černou kontrolní linkou, objeví ve výsledkové zóně červená linka.

Test je pozitivní na adenovirus, jestliže se do 10 minut, spolu s černou kontrolní linkou, objeví ve výsledkové zóně modrá linka.

Test je možno interpretovat jako pozitivní, jakmile se ve výsledkové zóně objeví dvě linky, z nichž jedna je černá (kontrolní). Relativní intenzita zabarvení je irelevantní k hodnotě výsledku.

V případě směsné infekce jak rotavirem, tak adenovirem se objeví ve výsledkové zóně červená i modrá linka.

Negativní výsledek (Obr./Fig.7)

Test je možno interpretovat jako negativní, jestliže se během 10 minut po přidavku vzorku ve výsledkové zóně objeví pouze černá kontrolní linka.

Neplatné vzorky (Obr./Fig.8)

Jestliže je buď adenovirová nebo rotavirová linka nebo obě zabarveny do hněda (nejsou čistě modré nebo červené), obsahuje vzorek látky způsobující nespecifickou aglutinaci. Výsledek je neplatný a doporučujeme proto vyžádat si nový vzorek.

Jestliže se ve výsledkové zóně během 10 minut po přidání vzorku černá kontrolní linka neobjeví, výsledek nelze interpretovat a doporučujeme buď opakovat test nebo si vyžádat nový vzorek.

Vysvětlivky k obrázkům

Control line = kontrolní linka

Rotavirus red line = rotavirová červená linka

Adenovirus blue line = adenovirová modrá linka

Rotavirus/Adenovirus brown line = rotavirová/adenovirová hnědá linka

No control line = žádná kontrolní linka

Result window = výsledková zóna

Sample area = zóna pro vzorek

10. Kontrola kvality

Funkční způsobilost testu Diarlex MB můžete zkontrolovat tak, že místo vzorku použijete jednu kapku Diarlex Rota Positive Control nebo Diarlex Adeno Positive Control, které obsahují inaktivované virové antigeny.

11. Analytické parametry měření

Byla provedena studie na virologickém oddělení Helsinské university mezi roky 1998 a 2001, ve které bylo testováno 914 vzorků stolice na přítomnost rotaviru a adenoviru elektronovou mikroskopií(EM) a testem Diarlex MB. 13 vzorků bylo z výsledků vyloučeno, protože buď u těchto vzorků chyběla elektronová mikroskopie nebo v testu Diarlex MB způsobovaly nespecifickou aglutinaci¹⁴.

Výsledky		EM	
		+	-
Diarlex MB Rota	+	137	8
	-	14	742

Citlivost 90,7%

Specificita 98,9%

Dohoda 97,6%

Výsledky		EM	
		+	-
Diarlex MB Adeno	+	34	21
	-	1	845

Citlivost 97,1%

Specificita 97,6%

Dohoda 97,6%

Reprodukovatelnost

Adenovirus

Byly testovány dvě různé šarže ve dvou dnech a každý test byl opakován 10krát pro každý vzorek¹⁴.

Vzorek	Správné výsledky	Přesně interpretované výsledky
Negativní stolice	Negativní	100%
Slabě pozitivní stolice	Pozitivní	100%
Pozitivní kontrola	Pozitivní	100%

Rotavirus

Byly testovány dvě různé šarže ve dvou dnech a každý test byl opakován 10krát pro každý vzorek¹⁴.

Vzorek	Správné výsledky	Přesně interpretované výsledky
Negativní stolice	Negativní	100%
Slabě pozitivní stolice	Pozitivní	100%
Pozitivní kontrola	Pozitivní	100%

Závěr: negativní vzorky, pozitivní vzorky a pozitivní kontrola dávají opakovaně shodné výsledky.

12. Interferující látky

Mekonium interferuje s měřením těmito testy, takže jej nelze jako vzorek použít.

12.1. Křížové reakce s viry

Nebyla nalezena žádná interference mezi protilátkami použitými v testu Diarlex MB a následujícími viry^{6,7,8,14}.

Rotavirová reakce

Adenovirus	Calicivirus
Astrovirus	Malé kulaté viry
Coronavirus	Poliovirus
Norwalk virus	

Adenovirová reakce

Echovirus 11
Coxsackievirus
Rotavirus
Poliovirus

12.2. Křížové reakce s bakteriemi

Nebyla nalezena žádná interference mezi protilátkami použitými v testu Diarlex MB a následujícími bakteriemi v koncentracích od 10^6 do 10^8 bakterií/ml¹⁴.

1. <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	10^8
2. <i>Escherichia coli</i>	klinický kmen	10^8
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	10^8
4. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 15038	10^8
5. <i>Candida albicans</i>	klinický kmen	10^6
6. <i>Proteus mirabilis</i>	klinický kmen	10^8
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	10^8
8. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	10^6
9. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12598	10^6
10. <i>Enterococci</i>	klinický kmen	10^8
11. <i>Clostridium difficile</i>	ATCC 9689	10^8

13. Omezení metody

Testy Diarlex MB určeny jako pomůcka při diagnostice rotavirové a adenovirové infekce a je důležité, aby výsledky testu byly zváženy ve spojitosti s klinickými symptomy pacienta. Přítomnost dalších patogenů není výsledky ani potvrzeno, ani vyloučeno. Pokud je podezření na suspektní bakteriální infekci, lékař může požadovat paralelní vyšetření na bakteriální agens.

Negativní výsledek testu Diarlex MB nevylučuje možnost infekce. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny nesprávným odběrem nebo pokud je vzorek odebrán později v průběhu onemocnění a ve stolici se nachází již málo virových částic^{1,9,10,11,12,13}.

14. Návaznost

Každá šarže reagensů je testována proti referenčnímu kmeni rotaviru získaném z Nebraska Calf Diarrhoea Virus, ATCC 452 a/nebo referenčnímu kmeni adenoviru získaném z lidského adenoviru, serotyp 3, ATCC VR-3.

15. Doporučení pro likvidaci

- Vybavení na více použití by mělo být po použití sterilizováno vhodným způsobem, nejlépe autoklávováno 1 hodinu při 121° C.
- Jednorázové pomůcky by měly být autoklávovány nebo spáleny.
- Ukápnutí potenciálně infekčních materiálů by mělo být okamžitě odstraněno buničitou vatou a kontaminované místo by mělo být potřeno standardním dezinfekčním prostředkem nebo 70 % alkoholem. Materiály použité pro čištění, včetně rukavic, je nutno likvidovat jako potenciálně nebezpečný biologický odpad.
- Reagencie obsahují azid sodný jako konzervační činidlo. Azid sodný uvolňuje toxický plyn, pokud je v kontaktu s kyselinami. Azidy mohou reagovat s kovovými uzávěry za vzniku explozivních sloučenin. Z těchto důvodů materiály likvidujte s velkým množstvím vody.

Literatura

Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Teplotní rozmezí: skladujte při teplotě 2...8°C



Použitelné do



39816-7

Viz návod k použití



Obsah

CONT

Reagencie

REAG

Pufr

BUF

Rota pozitivní kontrola

ROTA CONTROL +

Adeno pozitivní kontrola

ADENO CONTROL +

Obsahuje azid sodný

CONT NAN₃

Původ králíčí a myší

ORIG RAB MOU

Výrobce:

Orion Diagnostica Oy
P.O. Box 83, FIN-02101 Espoo, Finland
Tel. +358-10-42 995; fax. +358-10-429 2794
www.oriondiagnostica.fi

Sídlo v ČR:

Orion Diagnostica-organizační složka
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6
Tel. 233 350 533, fax 233 350 532
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz
www.oriondiagnostica.cz

Originální příbalová informace: 39816-7

Datum poslední revize textu: 15.7.2005