



Pyloriset® EIA-A III

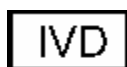
Kat. č. 68107

Návod k použití



Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Obsah

CONT

Obsahuje azid sodný

CONT NaN₃

Pufr pro ředění séra

DIL SPE

Koncentrát promývacího roztoku

BUF WASH 10x

Konjugát

CONJ

Kalibrátor # (1-4)**CAL #****TMB substrát****SUBS TMB****Stopovací roztok 0,5 M H₂SO₄****H₂SO₄ 0.5M****Původ lidský****ORIG HUM****Původ králičí****ORIG RAB**

Pyloriset® EIA-A III

1. URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Pyloriset EIA-A III je enzymoimunoanalýza k detekci a měření IgA protilátek proti *Helicobacter pylori* v lidském séru jako pomoc při diagnostikování infekce *Helicobacter pylori*. Výrobek je určen pro testování pacientů se symptomy nemocí gastrointestinálního traktu a jejich následného sledování po farmakologické léčbě.

PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ IN VITRO.

2. ÚVOD

V roce 1983 Marshall Warren vykultivoval nový patogen z pacientů s gastritidou¹. Od té doby studie ukázaly, že *Helicobacter pylori* způsobuje chronickou gastritidu² a že je spojitost mezi *H. pylori* infekcí a peptickými vředy^{3,4,5}. *H. pylori* infekci má téměř 100% pacientů s duodenálním vředem^{6,7} a 70% z těch, kteří mají gastrický vřed^{2,8,9}. *H. pylori* byl detekován u asi 8 pacientů z deseti s rakovinou žaludku^{10,11} a infekce byla klasifikována jako karcinogenní¹².

Jakmile je diagnostikována infekce *Helicobacter pylori*, pacient může být léčen antimikrobiálními léky. Úspěch eradikace *H. pylori* vede k vymizení gastrického zánětu¹³. Eradikace *H. pylori* u pacientů s duodenálním vředem vede ke zhojení vředu a k redukci počtu vředových relapsů^{14,15}.

Pro diagnostiku *H. pylori* infekce jsou nyní dostupné některé techniky jak invazivní, tak neinvazivní. Invazivní metody vyžadují sběr více malých množství bioptických vzorků odebraných během endoskopie horního gastrointestinálního traktu. *H. pylori* je identifikován kultivací, histologickou zkouškou nebo ureázovým testem bioptických vzorků. Ačkoliv jsou běžně používány, invazivní metody jsou spíše zdlouhavé a odběr vzorků může mít za následek pacientův diskomfort.

Dostupné neinvazivní metody zahrnují dechový ureázový test, detekce *H. pylori* antigenu ve vzorcích stolice a serologickou detekci protilátek proti *H. pylori*.

H. pylori vyvolává v infikovaných osobách specifickou serologickou odpověď. IgM protilátky mohou být detekovatelné v časných stádiích aktivní infekce. Hladiny IgG a IgA stoupají během infekce a zůstávají vysoké nebo za čas pozvolně klesají^{16,17}.

Po úspěšné eradikaci H. pylori mikrobiální terapií klesají pozvolně jak IgG tak IgA protilátky^{18,19,20}. Úspěšnost antimikrobiální léčby může být confirmována detekcí změny hladin specifických protilátek během 3 – 6 měsíců od začátku terapie²¹.

3. PRINCIP METODY

Test Pyloriset EIA–A III zjišťuje H. pylori protilátky v séru pomocí enzymoimunoanalýzy. Vzorky séra jsou napipetovány do jamek mikrotitrační destičky koutované antigenem H. pylori. Pokud jsou IgA protilátky ve vzorku přítomny, dojde k reakci s antigenem navázaným na povrchu jamky. Zbylý vzorek je vymyt a přidán reagent s protilátkou proti lidskému IgA s navázanou křenovou peroxidázou. Enzymový konjugát se váže na komplex antigen-protilátka, nenavázaný konjugát je vymyt a přidán substrát. Po zastavení reakce se substrátem se měří barva roztoku fotometrem. Intenzita zabarvení je úměrná koncentraci H. pylori specifických IgA protilátek v séru.

4. REAGENCIE

4.1. Obsah kitu Pyloriset EIA-A III

Kat. č. 68107

Mikrotitrační destičky 12x8 jamek koutovaných nereaktivním H. pylori antigenem (96 jamek)	1 destička
DIL SPE Pufr k ředění séra (zelený), připraven k použití, konzervační činidlo: <0,1% azidu sodného	200 ml
BUF WASH 10X Promývací pufr , 10x koncentrovaný Konzervační činidlo: 0,05% brom-nitro-dioxan	200 ml
CONJ Enzymový konjugát (modrý), připraven k použití Protilátka proti lidskému IgA (králičí) konjugovaná peroxidázou Konzervační činidlo: 0,03% brom-nitro-dioxan	15 ml
CAL1 CAL2 CAL3 CAL4 Kalibrátor 1,2,3 a 4 (lidský), připraven k použití (zelený) Konzervační činidlo: <0,1% azidu sodného	4 x 1,5 ml
SUBS TMB TMB – substrát , připraven k použití 3,3`5,5` - tetrametylbenzidin 1,25mmol/l	15 ml
H₂SO₄ 0.5M Stopovací roztok 0,5 M H ₂ SO ₄	20 ml

Reagencie obsahují azid sodný – čtěte „**Upozornění a varování**“.

4.2. Materiály požadované, ale nedodávané

- pipety o objemech 10 µl, 100 µl a 1-2 ml
- zkumavky pro ředění vzorků (přednostně polypropylenové)
- vibrační míchadlo
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- třepačka pro mikrotitrační destičky
- přístroj pro aspiraci a promývání stripů (pásků destičky), destiček nebo multikanálová pipeta. Doporučena je automatická promývačka stripů
- fotometr pro mikrotitrační destičky s vlnovou délkou 450 nm.

5. SKLADOVÁNÍ

Všechny reagensie uchovávejte při 2...8°C. Nepoužívejte po expiračním datu, který je vytištěn na krabičce kitu.

6. UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ

Varování s ohledem na zdraví a bezpečnost

- Test Pyloriset EIA – A III je pro diagnostické použití **in vitro**.
- Pufr k ředění sér a kalibrační séra 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.
- Kalibrační séra jsou lidského původu; byla testována na HBsAg a protilátky proti HCV a HIV – 1 & 2. Jsou používány pouze séra negativní na HBsAg a HCV, HIV 1&2 protilátky. Ačkoliv materiály testu neobsahují infekční agens těchto virů, přesto je třeba s nimi zacházet a je likvidovat jako materiály s potenciálním biologickým rizikem, protože byly připraveny z biologických surovin (viz. Manuál Centra pro kontrolu chorob/ Národního institutu zdraví „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“, květen 1988)
- Mikrotitrační stripy jsou koutované neaktivním H. pylori antigenem. Když manipulujete se stripy, dodržujte správnou laboratorní praxi. Vzorky pacientů mohou také obsahovat infekční agens. Při práci zacházejte se vzorky jako s materiály s potenciálním biologickým rizikem, takže používejte ochranné rukavice (viz. výše)
- Nepipetujte pusou.
- Stopovací roztok obsahuje 0,5 M kyselinu sírovou, která může dráždit kůži nebo mukózní sliznice. V případě potřísnění místo důkladně opláchněte vodou. V případě kontaktu s očima, oplachujte je po dobu alespoň 15 minut a vyhledejte lékařskou pomoc.
- Klinické vzorky a komponenty soupravy likvidujte podle předpisů.

Procedurální varování

- Nepoužívejte reagensie po době expirace.
- Buďte opatrní a nekontaminujte reagensie mikroorganismy. Po použití lahvičky pečlivě uzavřete. Pro skladování vraťte reagensie do teploty 2...°C okamžitě po použití.
- Nemíchejte reagensie ze souprav různých šarží, s výjimkou pufru k ředění sér, TMB substrátu, roztoku k zastavení reakce a promývacího pufru.

7. SBĚR VZORKU A MANIPULACE S NÍM

- Se vzorky pacientů manipulujte jako s materiálem schopným přenášet infekční agens.
- Krevní vzorky sbírejte asepticky píchnutím do žíly a sérum připravte běžnou laboratorní technikou.
- Jestliže nejsou vzorky testovány okamžitě, měly by být uloženy při 2...8°C a otestovány do 7 dnů. Skladování delší čas se doporučuje při teplotě -20°C nebo menší. Vyhybejte se opakovanému zmrazování a rozmrazování séra pacienta.
- Před odběrem krevních vzorků nemusí pacienti hladovět, ale vysoce lipemická séra mohou způsobit chyby ve výsledku a neměly by proto být používány k testování.

8. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Reagencie vyndejte z ledničky a nechte před použitím vytemperovat na 18...25°C. Nepoužívané reagencie uchovávejte při 2...8°C.

8.1. Mikrotitrační stripy

Mikrotitrační destičky mohou být děleny na 12 stripů po 8 jamkách. Pokud je to nutné, každý ze stripů je možno dále dělit na jednotlivé jamky a vložit zpět do rámu destičky. Otevřete fólii a vyjměte z ní požadované množství stripů nebo jamek a rám destičky. Nepoužité stripy a váček se silica gelem vložte do skladovacího sáčku a pečlivě uzavřete zavíracím páskem. Jakmile poprvé otevřete fólii, jsou nepoužité stripy stabilní po dobu 2 měsíců, jsou-li skladovány s vysušující látkou a při 2...8°C.

8.2. Promývací pufr

Rozřeďte koncentrovaný promývací pufru destilovanou nebo deionizovanou vodou 1+9, např. 100ml promývacího pufru a 900 ml vody. Důkladně promíchejte. Naředěný promývací pufr je stabilní po dobu 4 měsíců, pokud je uchováván při 2...8°C.

8.3. Enzymový konjugát

Enzymový konjugát je připraven k použití. Jestliže použijete méně než 12 stripů, pipetujte pouze potřebné množství konjugátu buď do zkumavky, nebo do malé lahvičky. Nepřelévajte celý obsah do jiné lahvičky tam a zpět, mohlo by to inaktivovat konjugát. Každý strip potřebuje 0,8 ml konjugátu, objem (15 ml v lahvičce) stačí na 1,25 ml na strip. Např. pro 6 stripů pipetujte 6 x 1,25 ml = 7,5 ml (přesný potřebný objem je 6 x 0,8 ml = 4,8 ml).

8.4. TMB – substrát

TMB substrát je připraven k použití. **Substrát chraňte před světlem.** Těsně před použitím napipetujte potřebné množství substrátu do jiné lahvičky nebo nádobky. TMB – substrát by před použitím měl být bezbarvý. Modrá barva indikuje zhoršení nebo kontaminaci reagentu.

8.5. Kalibrační séra 1 – 4

Kalibrační séra jsou předředěna a jsou připravena k použití. Hodnota kalibrátorů je vytištěna na štítcích lahviček.

8.6. Ředění vzorků séra

Před ředěním každý vzorek séra jemně promíchejte na vibračním míchadle. Řed'te puftrem k ředění sér 1 do 201 (1 + 200). Důkladně promíchejte. Např. 10 µl séra + 2 ml pufru k ředění sér.

9. PRACOVNÍ POSTUP

9.1. Test

Inkubace vzorku

1. Pipetujte 100 μ l každého z kalibračních sér (1 – 4) do testovacích jamek A1 – D1. **(Všimněte si! Používejte neřaděné!)**

Napipetujte 100 μ l každého z řaděných sér pacientů do následujících jamek (viz. obr. 1)

Napipetujte 100 μ l každého z kalibračních sér (1 – 4) do jamek následujících za poslední jamkou se sérem pacienta.

2. Inkubujte na třepačce při 18...25°C po dobu **30 minut** . Používejte rychlost třepání 700 – 1000 rpm.
3. Každou jamku odsajte a promyjte třikrát promývacím pufrem, jak je popsáno v bodu 9.2. Postup promývání. Po posledním promývacím kroku vysajte zbytky promývacího pufru ve stripech do buničité vaty.

Obr./Fig 1, originální příbalová informace, str.11.

Inkubace s konjugátem

1. Napipetujte 100 μ l enzymového konjugátu do každé z jamek.
2. Inkubujte na třepačce při 18...25°C po dobu **30 minut**.
3. Odsajte každou z jamek a propláchněte je třikrát promývacím pufrem, jak je popsáno v 9.2. Postup promývání. Po posledním promývacím kroku vysajte zbytky promývacího pufru ve stripech do buničité vaty.

Inkubace se substrátem

1. Napipetujte 100 μ l roztoku substrátu do každé z jamek.
2. Inkubujte na třepačce při 18...25°C po dobu **10 minut**.
3. Do každé jamky **přidejte** 100 μ l stopovacího roztoku, enzymová reakce se tím zastaví.

Měření absorbance

1. Změřte blank fotometrem bez mikrotitrační destičky (vzdušný blank).
2. Odečtěte absorbance každé jamky při 450 nm **do 10 minut** po zastavení reakce.

9.2. Postup promývání

Manuální promývání s použitím aspirátoru

1. Vysajte jamky prvního stripu.
2. Naplňte jamky promývacím pufrem o objemu alespoň 300 μ l.
3. Opakujte body 1 a 2 pro každý strip zvlášť.
4. Opakujte body 1-3 znovu ještě 2x.
5. Vysajte obsah jamek.
6. Poklepejte na buničitou vatu, aby došlo k odstranění zbytků promývacího pufru po posledním promývání.

Promývání multikanálovou pipetou

Jestliže nemáte vhodnou manuální promývačku, vytřeste obsah jamek do jednorázové nádoby. Delší strany rámu stripů tlačte k sobě, aby stripy nevypadly ven. Jamky všech stripů naplňte promývacím pufrem, jamky vyprázdněte a tento postup, opakujte ještě 2x. Po posledním promytí poklepejte na buničitou vatu, aby došlo k odstranění zbytků promývacího pufru po posledním promývání.

Automatická promývačka stripů

Proveďte 3 promývací cykly s promývacím pufrem a vyberte program, který obsahuje postup popsany v bodě pro manuální promývání. Dejte pozor na následující body:

1. Použijte program pro mikrotitrační destičky s plochým dnem.
2. Jamky naplňte plně promývacím pufrem, doporučujeme 300-500 μ l tohoto pufru.
3. Po posledním promývání poklepejte na buničitou vatu, aby došlo k odstranění zbytků promývacího pufru.

Není dovoleno po posledním promývacím kroku jamky sušit.

9.3. Kalkulace výsledků**Kvantitativní výsledky**

Jsou-li kalibrační a patientská séra testována v duplikátu, vypočítejte průměr odečtených absorbancí. Nakreslete bod po bodu kalibrační křivku na semilogaritmický papír s použitím absorbancí kalibrátorů: jednotky kalibrátorů na osu x (logaritmicky) a jednotlivé absorbance na osu y (viz. obr. 2). Odečtěte hodnotu v jednotkách pacientova séra s použitím této kalibrační křivky.

Jestliže je absorbance vzorku vyšší než nejvyšší kalibrační sérum, tj. jednotky nelze odečíst na kalibrační křivce, otestujte sérum ještě jednou s ředěním 1 do 401 (1 + 400). Pro získání pravdivého výsledku dosaženou hodnotu v jednotkách s tímto ředěním násobte dvěma.

Kvalitativní výsledky

Jestliže postačují kvalitativní výsledky (+/-), spočítejte průměr absorbancí kalibračního séra 2. Srovnajte absorbanci každého vzorku s hodnotou absorbance tohoto kalibrátoru.

Automatický analyzátor

Jestliže použijete automatické fotometry, je třeba použít vhodný softwarový program pro kalkulační výsledků.

Obr./Fig 2, originální příbalová informace, str. 13.

Vysvětlivky ke grafu:	Cal 1	kalibrační sérum 1
	Cal 2	kalibrační sérum 2
	Cal 3	kalibrační sérum 3
	Cal 4	kalibrační sérum 4
Example: Sample absorbance		Např. absorbance vzorku

9.4. Kontrola kvality

Všechna kalibrační séra by měla být testována pokaždé, když používáte soupravu. Správná funkce testu může být ověřena pozorováním absorbančních hodnot kalibračních sér.

Absorbance kalibračního séra 1 by měla být pod 0,200. Absorbance kalibračního séra 4 by měla být alespoň 0,800.

Pro větší správnost výsledků se doporučuje testovat séra pacientů v duplikátu, dokud laboratoř nebude v testování dostatečně zběhlá.

10. INTERPRETACE A KLINICKÁ SIGNIFIKANCE VÝSLEDKŮ TESTU

10.1. Interpretace

Pyloriset EIA-A III Výsledky U/ml	Interpretace
≥ 20	Pozitivní na H. pylori protilátky
< 20	Negativní na H. pylori protilátky

Jestliže U/ml nebo absorbance vzorku séra je rovno nebo vyšší než kalibračního séra 2, výsledek se považuje za pozitivní na H. pylori protilátky. Jestliže U/ml nebo absorbance vzorku séra je nižší než kalibračního séra 2, výsledek se považuje za negativní na H. pylori protilátky

10.2. Klinická signifikance výsledků testu

Negativní výsledky indikují, že pacient nemá detekovatelné hladiny IgG protilátek proti H. pylori. To se může stát i v případě, že se testuje pacient v časném stádiu infekce, předtím než stoupne imunitní odpověď. Přibližně 30% infikovaných osob nevytváří IgA protilátky proti H.pylori³⁰.

Pozitivní výsledky testu nerozlišují mezi aktivní a pasivní nemocí nebo kolonizací pacienta. Pozitivní výsledek testu nezbytně nemusí indikovat gastrointestinální poruchu.

Tak jako u jiných serologických testů, výsledek by měl být interpretován s ohledem na pacientovy příznaky – symptomy a diagnostická kritéria.

11. OMEZENÍ

Pracovní postup jiný než specifikovaný v této příbalové informaci může přinést sporné výsledky.

Vyhňte se používání vysoce lipemických, hemolyzovaných nebo mikrobiálně kontaminovaných sér pacientů.

Jestliže Pyloriset EIA-A III používáte k testování protilátek v séru pacientů při sledování léčby, všechna séra celého sledování musí být testována současně, aby výsledky byly co nejpřesnější.

Odečty absorbací jsou přímo úměrné k logaritmu koncentrace protilátek (U/ml). Malé rozdíly v odečtech absorbací replikátů mohou vést k velkým rozdílům v hodnotách titru protilátek

Testy Pyloriset EIA-A III by měly být prováděny pouze u pacientů symptomatických pro gastrointestinální poruchu.

12. ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

Citlivost a specificita

Citlivost a specificita testu Pyloriset EIA-A III byly zjištěny ze vzorků sér od 194 pacientů, kteří měly symptomy a navštěvovali gastroenterologickou kliniku. Výsledky byly srovnány s biotickými vzorky (tabulka 1)

Korelace mezi Pyloriset EIA-A III a výsledky z kultivace/histologie (n = 194)		Kultivace/histologie	
		+	-
Pyloriset EIA-A III	+	73	10
	-	3	108

Citlivost 96,1% (88,9 – 99,2%)

Specificita 91,5% (85,0 – 95,9%)

Dohoda 93,3%

95% interval nejistoty měření je v závorkách.

Inter-assay preciznost (precision)

Inter-assay preciznost (precision) byla testována dvěma laboratorními pracovníky.

Pracovník A testoval šest (6) vzorků séra v duplikátech v šesti (6) kolech. Průměry koncentrací protilátek proti H.pylori se pohybovaly v rozmezí 13 jednotek až 209 jednotek/ ml. Průměrný variační koeficient (CV%) duplikátů byl 3,2% (rozmezí od 1,2% do 5,4%). Průměrný CV% single měření byl 3,4% (rozmezí od 1,0% do 6,6%).

Pracovník B testoval deset (10) vzorků séra v duplikátech v šesti (6) kolech. Průměry koncentrací protilátek proti H.pylori se pohybovaly v rozmezí 15 jednotek až 166 jednotek/ ml. Průměrný variační koeficient (CV%) duplikátů byl 6,0% (rozmezí od 2,4% do 16,3%). Průměrný CV% single měření byl 6,5% (rozmezí od 1,9% do 11,9%).

Intra-assay preciznost (precision)

Inter-assay preciznost (precision) byla testována dvěma laboratorními pracovníky, z nichž oba měřili sedm (7) různých vzorků séra ve dvanácti (12) replikátech.

Průměry koncentrací protilátek proti H.pylori ve vzorcích měřených pracovníkem A se pohybovaly v rozmezí od 19 do 227 jednotek/ml. Průměrný CV% byl 4,1% (rozmezí 2,8% - 6,5%). Průměry koncentrací protilátek proti H.pylori ve vzorcích měřených pracovníkem B se pohybovaly v rozmezí od 14 do 152 jednotek/ml. Průměrný CV% byl 5,7% (rozmezí 3,4% - 9,7%).

Křížové reakce

Následující testované mikroorganismy vylučují možnost křížové reakce:

Proteus mirabilis

Staphylococcus aureus

Klebsiella pneumonia

Enterobacter aerogenes

Pseudomonas aeruginosa

Escherichia coli

Campylobacter fetus

Campylobacter jejuni

Výsledky testu indikují, že Pyloriset EIA- A III nereaguje zkříženě se žádným z těchto organismů.

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 E-mail: orion@oriondiagnostica.cz www.oriondiagnostica.cz
Originální příbalová informace:	39933-4
Datum poslední revize textu:	19.3.2006