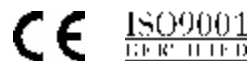


Pyloriset® EIA-G III

Kat. č. 68063

Návod k použití



1. URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Pyloriset EIA-G III je enzymoimunoanalýza k detekci a měření IgG 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 biotických vzorků odebraných během endoskopie horního gastrointerstinálního traktu. *H. pylori* je identifikován kultivací, histologickou zkouškou nebo ureázovým testem biotických vzorků. Ačkoliv jsou běžně používány, invazivní metody jsou spíše zdoluhavé 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 potvrzena detekcí změny hladin specifických protilátek během 3 – 6 měsíců od začátku terapie²¹.

3. PRINCIP METODY

Test Pyloriset EIA-G III zjišťuje H. pylori protilátky v séru pomocí enzymoimunoanalýzy. Vzorky séra jsou napipetovány do jamek mikrotitrační destičky koutované H. pylori antigenem. Pokud jsou IgG protilátky ve vzorku přítomny, dojde k reakci s antigenem navázaným na povrchu jamky. Zbylý vzorek je vymyt a je přidán reagent s protilátkou proti lidskému IgG 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 IgG protilátek v séru.

4. REAGENCIE

4.1 Obsah kitu Pyloriset EIA-G III

Kat. č. 68063

Mikrotitrační destičky (Microtitration strips)	12x8 jamek koutovaných nereaktivním H. pylori antigenem (96 jamek)	1 destička
---	---	------------

DIL SPE

Pufr k ředění séra (zelený), připraven k použití (Serum Dilution Buffer)	200 ml
Konzervační činidlo: <0,1% azidu sodného	

BUF WASH 10X

Promývací pufr, 10x koncentrovaný (Washing Buffer)	200 ml
Konzervační činidlo: 0,05% brom-nitro-dioxan	

CONJ

Enzymový konjugát (červený), připraven k použití (Enzyme Conjugate)	15 ml
Protilátka proti lidskému IgG (králičí) konjugovaná peroxidázou	
Konzervační činidlo: 0,03% brom-nitro-dioxan	

CAL

Kalibrátor 1,2,3 a 4 (lidský), připraven k použití (zelený) (Calibration serum)	4 x 1,5 ml
Konzervační činidlo: <0,1% azidu sodného	

SUBS TMB

TMB – substrát, připraven k použití (TMB Substrate) 3,3',5,5' - tetrametylbenzidin 1,25mmol/l	15 ml
--	-------

H₂SO₄ 0.5M

Spopovací roztok 0,5 M H ₂ SO ₄ (Stopping solution)	20 ml
--	-------

Návod k použití

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 reagentie 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 –G III je pouze 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 reagentií 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, 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 reagentie po době expirace.
- Buďte opatrní a nekontaminujte reagentie mikroorganismy. Po použití lahvičky pečlivě uzavřete. Pro skladování vraťte reagentie do teploty 2...°C okamžitě po použití.
- Nemíchejte reagentie 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. Vyhněte 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

Rozředte 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. Nepřelévejte 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 $6 \times 1,25 \text{ ml} = 7,5 \text{ ml}$ (přesný potřebný objem je $6 \times 0,8 \text{ ml} = 4,8 \text{ ml}$).

8.4. TMB – substrát

TMB substrát je připraven k použití. **Substrát chraňte před světlem.** Před použitím napipetujte potřebné množství substrátu do jiné lahvičky nebo nádoby. 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 vyištěna na štítcích lahviček.

8.6. Ředění vzorků séra

Před ředěním každý vzorek séra jemně promíchejte na vibračním míchadle. Řed'te pufrem 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 µl každého z kalibračních sér (1 – 4) do testovacích jamek A1 – D1. *(Všimněte si! Používejte neředěné!)*
Napipetujte 100 µl každého z ředěných sér pacientů do následujících jamek (viz. obr. 1)
Napipetujte 100 µl 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 100µl 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 µl roztoku substrátu do každé z jamek.
2. Inkubujte na třepačce při 18...25°C po dobu **10 minut**.
3. Do každé jamky **přidejte** 100 µl 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 µl.
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 vatou, aby došlo k odstranění zbytků promývacího pufru po posledním promývání.

Automatická promývačka stripů

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

1. Používejte 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 vatou, 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 kalkulaci výsledků.

Obr. 2/ 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 kit. 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-G 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.

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-G 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 absorbancí replikátů mohou vést k velkým rozdílům v hodnotách titru protilátek

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

12. ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

Citlivost a specificita

Citlivost a specificita Pyloriset EIA-G III byly zjištěny ze vzorků sér od 205 pacientů, kteří měly symptomy a navštěvovali gastroenterologickou kliniku. Výsledky byly srovnány s biotickými vzorky (tabulka 1)

Tabulka 1 Korelace mezi Pyloriset EIA-G III a výsledky z kultivace/histologie (n = 205)		Kultivace/histologie	
		+	-
Pyloriset EIA-G III	+	82	7
	-	0	116

Citlivost 100% (95,6 – 100%)

Specifická 94,3% (88,6 – 97,7%)

Dohoda 96,6%

95% interval nejistoty měření je v závorkách.

Inter-assay preciznost (precision)

Osm (8) vzorků séra s koncentracemi v rozmezí 18 jednotek až 490 jednotek byly měřeny v šesti (6) kolech, průměrná CV % byla 7,8% (od 3,8 do 13,1%).

Intra-assay preciznost (precision)

Sedm (7) různých vzorků séra s koncentracemi od 18 do 380 jednotek byly měřeny ve 12 replikátech, průměrná CV % byla 4,2% (od 1,7 do 8,9%).

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-G III nereaguje zkříženě se žádným z těchto organismů.

Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

IVD

Katalogové číslo

REF

Číslo šarže

LOT

Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Obsah

CONT

Obsahuje azid sodný

CONT NaN₃

Pufř pro ředění séra

DIL SPE

Konzentrát 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

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:

39932-5

Datum poslední revize textu:

26.2.2005