

	Clostridium difficile GDH ir toksinai A + B nustatymas fekalijose
Platintojas : UAB "Diagnostinės Sistemos" Kalvarijų sodų 1-oji g 2, LT-08315 Vilnius Tel. 8 5 2740494, Fak. 8 5 2777620	

PASKIRTIS

Greitas kokybinis imunochromatografinis Clostridium difficile GDH ir toksinų A+B antigenų nustatymas tiriant žmogaus fekalijas. Skirta in vitro diagnostikai.

BENDRA INFORMACIJA

Clostridium difficile – anaerobinės bakterijos ir oportunistiniai patogenai, kurios auga žarnyne, kai antibiotikų terapijos pasekoje suardoma normali žarnyno mikroflora [1,2,3]. Toksiški C.difficile štamai gali sukelti negalavimus nuo švelnios diarėjos iki pseudomembraninio kolito pavojingo gyvybei [4].

Toksiški C.difficile antigenų štamai: toksinas A (audinius pažeidžiantis enterotoksinas) ir toksinas B (citotoksinas). Kai kurie štamai išskiria abu A ir B toksinus, kai kurie kiti štamai išskiria tik toksiną B. Dėl trečio (dvigubo) toksino iki šio vyksta svarstymai [4].

C. difficile Gliutamato Dehidrogenazės (GDH) antigeno žymens paplitimo poveikis gali būti aktyvus, nes visi štamai išskiria didelius kiekius fermentų [5,6]. Naudojant šį tyrimą galima nustatyti GDH, toksinų a ir B specifinius Clostridium difficile antigenus fekalijų ėminiuose.

REAKCIJOS PRINCIPAS

Clostridium difficile GDH ir toksinų A+B rinkinys gali nustatyti tris skirtingus antigenus fekalijose. Tyrimo plokštelės membranoje yra pažymėtos trys juostelės skirtos šių antigenų nustatymui.

C. difficile specifinis GDH: membrana dengta antikūnais prieš C. difficile antikūnais ir tyrimo juostoje antikūnais prieš C. difficile GDH. Tyrimo eigoje mėginys chromatografiškai juda plokštelės membrana aukštyn ir membranoje reaguoja su antikūnais prieš C.difficile GDH, pasikeičia juostelės spalva.

C. difficile specifinis toksinui A: membrana dengta antikūnais prieš C. difficile toksiną A ir tyrimo juostoje antikūnais prieš C. difficile toksiną A. Tyrimo eigoje mėginys chromatografiškai juda plokštelės membrana aukštyn ir membranoje reaguoja su antikūnais prieš C. difficile toksiną A, pasikeičia juostelės spalva. Juostelės spalvos pasikeitimas parodo teigiamą reakcijos rezultatą, jei spalvos pasikeitimo nėra – neigiamas reakcijos rezultatas. Membranoje integruota kokybės kontrolės juostelė ir ji visada turi būti teigiama, t.y. pasikeisti juostelės spalva, tai patvirtina, kad naudoti kokybiški reagentai ir tyrimo eiga teisinga.

C. difficile specifinis toksinui B: membrana dengta antikūnais prieš C. difficile toksiną B ir tyrimo juostoje antikūnais prieš C. difficile toksiną B. Tyrimo eigoje mėginys chromatografiškai juda plokštelės membrana aukštyn ir membranoje reaguoja su antikūnais prieš C. difficile toksiną B, pasikeičia juostelės spalva. Juostelės spalvos pasikeitimas parodo teigiamą reakcijos rezultatą, jei spalvos pasikeitimo nėra – neigiamas reakcijos rezultatas. Membranoje integruota kokybės kontrolės juostelė ir ji visada turi būti teigiama, t.y. pasikeisti juostelės spalva, tai patvirtina, kad naudoti kokybiški reagentai ir tyrimo eiga teisinga.

REAGENTAI

Plokštelė dengta antikūnų prieš-C.difficile antigenų GDH ir toksinus A+B auginsio surišę dalelėmis sujungiančiomis su dengta membranoje prieš-C.difficile antigenų GDH ir toksinus A+B.

ISPĖJIMAI

1. Skirta tik profesionaliam naudojimui in-vitro diagnostikai. Nenaudoti pasibaigus galiojimo laikui.
2. Plokštelę galima išpakuoti tik prieš tyrimą.
3. Darbo aplinkoje negalima valgyti, gerti, rūkyti.
4. Atliekant tyrimus būtina laikytis darbo su pavojingomis infekcijomis reikalavimų.
5. Tyrimo metu dėvėkite darbinis rūbus, pirštines, apsauginius akinius.
6. Utilizuojant laikytis bendros darbo laboratorijoje tvarkos.
7. Aplinkos drėgmė ir temperatūra gali įtakoti tyrimų rezultatus.

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Rinkinys gali būti laikomas kambario temperatūroje 2-30° C temperatūroje. Tyrimo plokštelės stabilumas yra iki datos nurodytos ant pakuotės. Plokštelės išpakuokite tik prieš tyrimą. Negalima užšaldyti. Nenaudoti pasibaigusio galiojimo laiko reagentų.

ĖMINIŲ SURINKIMAS

Rekomenduojama surinktas fekalijas kuo greičiau ištirti. Jei jos neištiriamos iškart, tai jas galima laikyti šaldytuve 2-8° C temperatūroje 3 dienas ar -20° C temperatūroje ilgesnį laikotarpį. Ekstrahuotas mėginys gali būti laikomas 2-8° C temperatūroje 1 savaitę ar -20° C temperatūroje ilgesnį laikotarpį. Svarbu, kad ėminiai prieš tyrimą nebūtų apdirbti formaldehidu ar panašiais tirpalais.

RINKINIO SUDĖTIS

- Tyrimo plokštelės/ar juostelės
- Mėginių surinkimo indeliai su ekstraciniu buferiu
- Naudojimo instrukcija

TYRIMAMS PAPILDOMAI REIKALINGOS PRIEMONĖS

Indeliai fekalijų surinkimui.

TYRIMO EIGA

Prieš tyrimą visi reagentai turi būti kambario temperatūros 15-30° C.

Mėginio paruošimas

1. Mėginio paruošimas:

a) kietos fekalijos: nuimkite mėgintuvėlio dangtelį ir paimkite fekalijų iš trijų skirtingų ėminio vietų, viso apie 50mg, ėminio paėmimui naudokite ne šaukštelį, o lopetėlę.

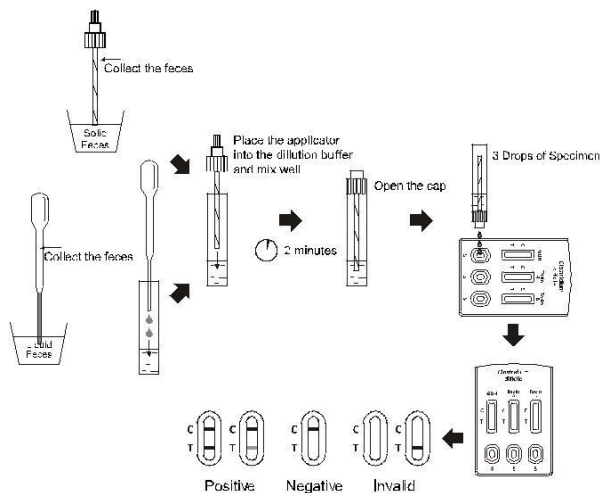
b) skystos fekalijos: į mėgintuvėlį su ekstraciniu buferiu pipete perkelti apie 2 lašus (apie 80µl) fekalijų

2. Dangteliu uždenkite mėgintuvėlį ir viduje esantį skystį išmaišykite, taip paruošiamas skystas fekalijų mėginys. Paruoštą mėginį ištirkite kuo greičiau. Tyrimo plokštelę prieš tyrimą išpakuokite iš hermetinės pakuotės ir rekomenduojama panaudoti valandos laikotarpyje. Plokštelė turi būti kambario temperatūros. Išpakuotą plokštelę rekomenduojama panaudoti iš karto.

3. Ant plokštelės į S langelį įlašinkite 3 lašus paruošto mėginio (120µl), venkite, kad nesusidarytu oro burbulai, fiksukite reakcijos pradžią

4. Po 10 minučių įvertinkite reakcijos rezultatą. Praėjus 20 minučių rezultato nebegalima vertinti.

5. Pastaba: jei užlašintas mėginys nejuda membrana link reakcijos zonos, tai tyrimą būtina pakartoti prieš tai paruoštą mėginį nucentrifuguojant, tokiu atveju tyrimui panaudojama 120µ nucentrifuguoto supernatanto.



REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Rezultatai gaunami trijuose reakcijų langeliuose (zonose) atskirai antigenams GDH, toksinui A, toksinui B.

Teigiamas : kai atsiranda 2 spalvotos juostelės; viena iš jų – kontrolės juostelė (C), o kita tyrimo juostelė (T).

Pastaba: spalvos intensyvumas rezultato vertinimo zonoje parodo hemoglobino koncentraciją išmatose. Bet koks spalvos pasikeitimas tyrimo zonoje vertinamas kaip teigiamas rezultatas.

Neigiamas : jei tyrimo zonoje spalvinio pasikeitimo nėra, o kontrolės zonoje atsiranda 1 spalvota juostelė, rezultatas neigiamas ir tinkamas vertinti.

Klaidingas : jei kontrolės zonoje spalvinio pasikeitimo nėra, tada nėra spalvos pasikeitimo tyrimo zonoje, rezultatas klaidingas ir netinkamas vertinti. Tyrimą būtina pakartoti iš naujo.

KOKYBĖS KONTROLĖ

Vidinė kokybės kontrolė yra integruota kiekviename tyrime. Reakcija C – kontrolės zonoje parodo, kad tyrimas atliktas teisingai ir visi naudojami reagentai yra tinkami vartojimui.

Išorinė kokybės kontrolė neįeina į rinkinio sudėtį. Gera laboratorinė praktika rekomenduoja jas naudoti.

TYRIMO APRIBOJIMAI

1. Skirta in vitro diagnostikai.
2. Tyrimas skirtas antigeno kokybiniam vertinimui, o ne kiekybiniam. Vertinant galutinius rezultatus būtina įvertinti klinikinius duomenis.
3. Gavus teigiamą rezultatą būtina atlikti papildomus testinius tyrimus.

LAUKIAMIEJI REZULTATAI

Tiriant sveikų žmonių fekalias rezultatas turi būti neigiamas.

Tyrimų rezultatai naudojant šiuos rinkinius buvo palyginti su kitais komerciniais rinkiniais, rezultatų atitikimas 98,5%.

PAGRINDINĖS CHARAKTERISTIKOS

Nustatomos ribos

Nustatomų ribų vertė – 1ng/ml C.difficile GDH, 2ng/ml C.difficile toksinui A ir 1ng/ml C.difficile toksinui B.

Jautrumas – specifiškumas

Clostridium difficile GDH antigeno tyrimų rezultatai

Metodas	Kiti greiti tyrimai		Bendri rezultatai
C.difficile GDH+ toksinų A+B greitas tyrimas	rezultatas	teigiamas	neigiamas
	teigiamas	78	2
	neigiamas	1	119
Bendras rezultatas	79	121	200
Santykinis jautrumas: 98,7% (95%CI: 93,16%~100%)			
Santykinis specifiškumas: 98,3% (95%CI: 94,2%~99,8%)			
Tikslumas: 98,5% (95%CI: 95,7%~99,7%)			

Clostridium difficile toksinų A+B antigenų tyrimų rezultatai

Metodas	Kiti greiti tyrimai		Bendri rezultatai
C.difficile toksinų A+B greitas tyrimas	rezultatas	teigiamas	neigiamas
	teigiamas	56	2
	neigiamas	1	141
Bendras rezultatas	57	143	200
Santykinis jautrumas: 98,2% (95%CI: 90,6%~99,9%)			
Santykinis specifiškumas: 98,6% (95%CI: 95,0%~99,8%)			
Tikslumas: 98,5% (95%CI: 95,7%~99,7%)			

Atsikartojamumas

Vertinant rezultatų atsikartojamumą tų pačių mėginių tyrimai, naudojant tų pačių serijų rinkinius buvo atlikti 15 kartų, kai kurie iš jų buvo tirti naudojant trijų skirtingų serijų rinkinius. Rezultatai pilnai sutapo.

Kryžminės reakcijos

Buvo ištirta ir patvirtinta, kad nėra C.difficile GDH ir toksinų A+B kryžminių reakcijų su kitais žarnynui būdingais patogenais: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *E.coli* 0157:H7, *H.pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*.

LITERATŪRA

1. Ramadass Balamurugan, V. Balaji and Balakrishnan S. Ramakrishna: *Estimation of faecal carriage of Clostridium difficile in patients with ulcerative colitis using real time polymerase chain reaction*, Indian Journal of Medical Research, p.472-477, May 2008
2. E. J. Kuijper, B. Coignard and P. Tüll: *Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe*, Review Clinical Microbiology and Infections, 12 suppl6, p. 2-18, Oct. 2006
3. Leyerly D.M., H.C. Krivan and D.T. Wilkins: *Clostridium difficile: its disease and toxins*. Clinical Microbiology Reviews, p. 1-18, Jan. 1988
4. Ramsey L. et al: *Fulminant Clostridium difficile: an underappreciated and increasing cause of death and complications*, Annals of Surgery 235 (3) p. 363-372: Mar. 2002
5. Wren MW., Kinson R., Sivapalan M., Shemko M., Shetty NR.: *Detection of Clostridium difficile infection: a suggested laboratory diagnostic algorithm*, British Journal of Biomedical Sciences, 66(4) p. 175-179, 2009.
6. Willis DH. And JA Kraft: *Confirmation that the latex-reactive protein of Clostridium difficile is a Glutamate Dehydrogenase*. Journal of clinical microbiology, 30, p. 1363-1364, May 1992

Simboliai

	Dėmesio		Produkto kodas
	Tik in vitro tikslais		Naudoti iki
	Saugoti tarp		Gamintojas
	Testų sk.		Vienkartiniam naudojimui