

PASKIRTIS

Greitas kokybinis chromatografinis Rotaviruso ir Adenoviruso nustatymas išmatose. Skirtas profesionaliam naudojimui in vitro diagnostikai.

BENDRA INFORMACIJA

Ūmi diarėja – itin paplitusi vaikų tarpe ir dažna mirštamumo priežastis besivystančiose šalyse [1]. Rotaviruso sukeltas ūmus gastroenteritas dažniausiai būdingas mažiems vaikams [2]. Pirmą kartą šis virusas buvo nustatytas 1973 metais tyrinėjant kūdikių gastroenteritą sukeltą neūmės bakterinės infekcijos. Rotavirusas plinta oro lašeliu, fekalijų būdais, inkubacinis periodas 1-3 dienos. Antigeno nustatymo tyrimams tinkamiausi ėminiai surinkti 2-5 dienomis susirgus, taip pat rotavirusas gali būti nustatomas tol kol yra diarėja. Rotaviruso sukeltas gastroenteritas gali būti mirtinai pavojingas šioms žmonių grupėms: kūdikiams, senyvo amžiaus bei pažeisto imuniteto pacientams [3]. Rotavirusas suaktyvėja šaltuoju metu periodu, dažniausiai žiemą. Buvo stebėta endeminių ir epideminių apie tūkstančio žmonių atvejų [4]. Buvo tirti su ūminėm žarnyno ligomis hospitalizuotų vaikų atvejai, apie 50% atvejų pasitvirtino Rotaviruso sukėlėjas. Virusas dauginasi ląstelių branduoliuose ir turi citopatinį poveikį (CPE). Rotavirusą sunku išauginti, todėl buvo išvystytas rotaviruso nustatymo fekalijose metodas.

Žarnyno adenovirusas, visų pirma Ad40 ir Ad41, po rotavirusų dažniausi diarėjos sukėlėjai [6,7,8,9]. Šis virusinis patogenas nustatomas visame pasaulyje ištisus metus. Šis virusas dažniausiai nustatomas vaikams iki 2 metų, tačiau galimas visoms amžiaus grupėms. Tolesni tyrimai parodė adenovirusai padaro apie 15% visų hospitalinių žarnyno susirgimo atvejų [5,6,7,8,9]. Greita Adenoviruso diagnostika svarbi nagrinėjant gastroenterito etiologiją. Kiti diagnostikos metodai, pvz. elektroninė mikroskopija, nukleino rūgšties hidrolizacija, yra brangūs ir reikalauja daugiau darbo. Todėl atlikus greitą tyrimą tolesnė aparatūrinė diagnostika nėra būtina.

Rotaviruso ir Adenoviruso nustatymo plokštelėje tiriant fekalijas, tai imunochromatografinis kokybinis tyrimas, rezultatas vertinamas po 10 reakcijos minučių. Reakcijoje dalyvauja antikūnai specifiniai rotavirusui.

REAKCIJOS PRINCIPAS

Rotavirusi ir Adenoviruso nustatymas fekalijose – kokybinis ofrotaviruso nustatymas žmogaus fekalijose. Tyrimo plokštelės membranos reakcijos zona T1 yra dengta antikūnais prieš-rotavirusą ir membranos reakcijos zona T2 yra dengta antikūnais prieš-adenovirusą. Reakcijos eigoje mėginys reaguoją su dalelėmis dengtomis antikūnais prieš-rotavirusą ir prieš-adenovirusą, susidaręs junginys membrana juda aukštyn reaguodamas su antikūnais prieš-rotavirusą ir prieš-adenovirusą, plokštelės tyrimo rezultato zonoje pasikeičia juostelės spalva. Juostelės spalvos pasikeitimas parodo teigiamą reakcijos rezultatą, o jei spalvos pasikeitimo nėra, tai neigiamas reakcijos rezultatas. Tyrimo kontrolei yra paruošta kontrolės zona plokštelės membranoje, ši spalvinė juosta turi atsirasti visose reakcijose ir parodo, kad tyrimo eiga yra teisinga, tyrimui naudojami tinkami reagentai ir mėginiai.

REAGENTAI

Plokštelė dengta antikūnų prieš-rotavirusą/prieš-adenovirusą dalelėmis.

IŠPĖJIMAI

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 laikykite 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

- Tyrimų surinkimui tinkamiausiai ėminiai rinkti esant ūmiems atvejais. Buvo nustatyta, kad tinkamiausi šiems tyrimams ėminiai surinkti 3-5 ūminės infekcijos dieną. Jei ėminiai surenkami vėliau ir dar pasibaigus diarėjai, tai surinkto ėminio sudėtyje gali būti per maža rotaviruso koncentracija ir tyrimo rezultatas bus neigiamas.
- Ėminiai turi būti surenkami į švairius, sausus, sandarius indelius be detergentų, stabilizatorių ar transportinių terpių.
- Prieš naudojimą reagentai turi būti kambario temperatūros.

RINKINIO SUDĖTIS

- Tyrimo plokštelės/ar juostelės
- Mėginių surinkimo indeliai su ekstrakciniu buferiu
- Naudojimo instrukcija, lašintuvas

TYRIMAMS PAPILDOMAI REIKALINGOS PRIEMONĖS

Atliekų konteineris, chronometras, 80μl pipetės

TYRIMO EIGA

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

1. Fekalių ėminio surinkimas: į švarų ir sausą indelį surinkite atitinkamą kiekį fekalijų (1-2ml, 1-2g). Rekomenduojamą tyrimą atlikti 6 valandų laikotarpyje po ėminio surinkimo. Prieš tyrimą ėminys gali būti laikomas šaldytuve 2-8° C temperatūroje 3 dienas, jei laikysite ilgiau šaldykite tai - 20° C.

2. 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 ekstrakciniu buferiu pipete perkelti apie 2 lašus (apie 50μl) fekalijų

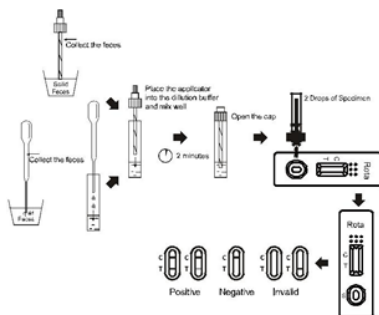
3. Dangteliu uždenkite mėgintuvėlį ir viduje esantį skystį išmaišykite, taip paruošiamas skystas fekalijų mėginys. Palikite 2 minutes pastovėti.

4. Tyrimo plokštelę prieš tyrimą išpakuokite iš hermetinės pakuotės ir rekomenduojama panaudoti iš karto išpakavus.

5. Ant plokštelės į S langelį įlašinkite 2 lašus paruošto mėginio (80μl), venkite, kad nesusidarytu oro burbulai, fiksukite reakcijos pradžią

6. Po 5 minučių įvertinkite reakcijos rezultatą. Praėjus 10 minučių rezultato nebegalima vertinti.

7. Pastaba: jei užlašintas mėginys nejuda membrana link reakcijos zonos, tai tyrimą būtina pakartoti prieš tai paruoštą mėginį nucentrifuguojant, tokiu atveju tyrimui panaudojama 80μ nucentrifuguito supernatanto.



REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Teigiamas rezultatas:

Rotavirusas teigiamas - jei kontrolės zonoje (C) ir vertinimo zonoje (T1) atsiranda aiškio spalvotos juostelės.

Adenovirusas teigiamas - jei kontrolės zonoje (C) ir vertinimo zonoje (T2) atsiranda aiškio spalvotos juostelės.

Rotavirusas ir Adenovirusas teigiami - jei kontrolės zonoje (C) ir vertinimo zonose (T1 ir T2) atsiranda aiškio spalvotos juostelės.

Pastaba: spalvų intensyvumas (T1 ir T2) zonose priklauso nuo rotaviruso ir adenoviruso antigenų koncentracijų tiriamajame mėginyje, bet koks spalvų pasikeitimas tyrimų zonose yra vertinamas kaip teigiamas rezultatas.

Neigiamas rezultatas: - jei kontrolės zonoje (C) atsiranda aiškio spalvotos juostelės, o tyrimo zonose (T1 ir T2) spalvų pasikeitimo nėra.

Klaidingas rezultatas: jei kontrolės zonoje (C) spalvinio pasikeitimo nėra. Dažniausios klaidingų rezultatų priežastys yra naudojamas netinkamas mėginio kiekis ar neteisinga tyrimo eiga. Tyrimą būtina atlikti iš naujo. Jei vėl gaunamas toks pat rezultatas, tai rinkinys nėra tinkamas naudoti, informuokite platintoją.

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. Gali būti naudojama tik rotaviruso ir adenoviruso nustatymo tyrimams. Jei norima vertinti virusų koncentraciją, tai reikia atlikti kiekybinius tyrimus.
2. Parodo rotaviruso ir adenoviruso antigenų buvimą fekalijose.
3. Vertinant galutinį rezultatą būtina įvertinti kitus tyrimus ir klininius duomenis.
4. Gavus teigiamą rezultatą būtina atlikti papildomus tęsinius tyrimus.

LAUKIAMIE REZULTATAI

Tyrimų rezultatai naudojant šiuos rinkinius buvo palyginti su kitais komerciniais rinkiniais, rezultatų atitikimas 97,2%.

PAGRINDINĖS CHARAKTERISTIKOS

Kliniškinis jautrumas, specifiškumas ir tikslumas

Viso buvo ištirti vaikų ir jaunuolių mėginiai, tyrimų rezultatai lyginti su rezultatais gautais tyrimams panaudojant latekso agliutinacijos metodą.

Tyrimo rezultatai parodė didelį šio tyrimo jautrumą ir specifiškumą.

Rotaviruso nustatymas plokštelėje metodo palyginimas su latekso agliutinacijos metodu

Metodas		Latekso agliutinacija		Bendri rezultatai
Rotaviruso nustatymas plokštelėje	Rezultatai	Teigiama	Neigiama	
	Teigiama	251	7	258
	Neigiama	7	235	245
Bendri rezultatai		258	243	501
Santykinis jautrumas: 97,3 % (95%CI: 94,5%–98,9%)				
Santykinis specifiškumas: 97,1% (95%CI: 94,2%–98,8%)				
Tikslumas: 97,2% (95%CI: 95,4%–98,5%)				
Metodas		Latekso agliutinacija		Bendri rezultatai
Adenoviruso nustatymas plokštelėje	Rezultatai	Teigiama	Neigiama	
	Teigiama	118	6	124
	Neigiama	6	251	257
Bendri rezultatai		124	257	381
Santykinis jautrumas: 95,2 % (95%CI: 89,8%–98,2%)				
Santykinis specifiškumas: 97,7% (95%CI: 95%–99,1%)				
Tikslumas: 96,8% (95%CI: 94,6%–98,4%)				

TIKSLUMAS vidinis

Šiam tyrimui buvo naudoti 4 mėginių replikos: neigiamos, silpnai teigiamos, teigiamos, stipriai teigiamos. Rezultatai atitiko >99%.

TIKSLUMAS išorinis

Šiam tyrimui buvo naudoti 4 mėginių replikos: neigiamos, silpnai teigiamos, teigiamos, stipriai teigiamos. Rezultatai atitiko >99%.

KRYŽMINĖS REAKCIJOS

Buvo vertinti reakcijų aktyvumai 1×10^9 organizmų/ml. Šių organizmų reakcijos su rotavirusu ir adenovirusu fekacijose gavosi neigiamos:

Staphylococcus aureus	Proteus mirabilis	Neisseria gonorrhoea
Pseudomonas aeruginosa	Acinetobacterspp	Group B Streptococcus
Enterococcus faecalis	Salmonella choleraesuis	Proteus vulgaris
Group C Streptococcus	Gardnerellavaginalis	Enterococcus faecium
Klebsiella pneumoniae	Acinetobactercalcoaceticus	Hemophilusinfluenzae
Branhamella catarrhalis	E.coli	Neisseria meningitidis
Candida albicans	Chlamydia trachomatis	

LITERATŪRA

1. Wadell, G. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practices. New York: Springer-Verlag, Volume II, 1988: 284-300.
2. WILHELM I, ROMAN E, SANCHEZ-FAUQUIER A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. April. 2003, vol.9:247-262
3. Cubitt, WD (1982) Rotavirus Infection: An Unexpected Hazard in Units Caring for the Elderly. Geriatric Medicine Today 1: 33-38
4. Hung, T et al (1984) Waterborne outbreak of Rotavirus Diarrhoea in Adults in China caused by a Novel Rotavirus. Lancet, May 26;1(8387): 1139-1142
5. Cukor, G, Perron, DM; Hudson, R and Blacklow, NR (1984) Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody. J. Clin. Micro. 19: 888-892
6. Wood, D. J. and A. S. Bailey. "Detection of Adenovirus Types 40 and 41 in Stool Specimens by Immune Electron Microscopy." Journal of Medical Virology, 1987; 21: 191-199.
7. Nishio, Osamu, M. Ooseto, K. Takagi, Y. Yamasita, Y. Ishihara, and S. Isomura. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Employing Monoclonal Antibodies for Direct Identification of Enteric Adenoviruses (Ad40, 41) in Feces." Microbiol. Immunol. 1990; 34(10): 871-877.
8. Wood, D. J., K. Bijlsma, J. C. de Jong, and C. Tonkin. "Evaluation of a Commercial Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay for Detection of Adenovirus Types 40 and 41 in Stool Specimens." Journal of Clinical Microbiology, June 1989; 27(6): 1155-1158.
9. Thomas, Eva. E., D. Roscoe, L. Book, B. Bone, L. Browne, and V. Mah. "The Utility of Latex Agglutination Assays in the Diagnosis of Pediatric Viral Gastroenteritis." Am. J. Clin. Pathol. 1994; 101:742-746.

Simboliai

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

Peržiūrėta 2017-03-23