

Noroviruso/ Rotaviruso/ Adenoviruso 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 chromatografinis Noroviruso/ Rotaviruso/ Adenoviruso nustatymas išmatose. Skirtas profesionaliam naudojimui in vitro diagnostikai.

BENDRA INFORMACIJA

Noroviruso tyrimas – greitas kokybinis chromatografinis noroviruso nustatymas žmogaus fekalijose. Reakcijoje dalyvauja specifiniai antikūnai reaguojantys su fekalijose esančiais noroviruso antigenais.

Norovirusas (NoV) genetiškai skirtingų grupių pavienės ribonukleoninės rūgšties dalys priklausančios Kalikiviridajai šeimai. Taip pat jie vadinami ir „smulkios apvalios struktūros virusai“ (STVS) ir jų sistematika buvo nustatyta naudojant šiuolaikines molekulinės technologijas. Nustatyti keturi SRSV antigenų tipai, šiuo metu nustatyti trys Noroviruso genotipai. 1 ir 2 genotipai yra būdingi žmonių infekcijoms, 3 genotipas yra susijęs su jaučių ir kiaulių infekcijomis.

Norovirusas - ūmus gastroenteritas dažniausiai būdingas įvairioje darbo aplinkoje. Tai užkrečiama infekcija, kuria gali sukelti kelios patekusios dalelės. Užsikrečiama per maistą ar vandenį jį nurijus ar perduodama žmogaus žmogui. Ji perduodama fekaliniu-oraliniu būdu ar per orą. Infekcija yra ūminė, dažnai švelni, plintanti šeimos rate, dažnai vyresnio amžiaus. Inkubacinis periodas gali būti 24-48 valandos, kartais net 12 valandų. Šiuo virusu galima užsikrėsti maitinimo įstaigoje, ligoninėje, kitose viešuose vietose. Labai svarbu šią infekciją nustatyti ir gydyti kūdikius, vyresnio amžiaus ir silpnos sveikatos pacientus.

Rotaviruso ir Adenoviruso tyrimas – greitas kokybinis chromatografinis rotaviruso ir adenoviruso nustatymas žmogaus fekalijose. Tyrimo laikas – 15 minučių. Reakcijoje dalyvauja specifiniai antikūnai kreguojantys su fekalijose esančiais rotaviruso ir adenoviruso antigenais.

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 neūmies bakterinės infekcijos. Rotavirusas plinta oro lašeliniu, 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 ūminė 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.

REAKCIJOS PRINCIPAS

Norovirusi nustatymas fekalijose – kokybinis viruso nustatymas žmogaus fekalijose. Tyrimo plokštelės membranos reakcijos zona yra dengta 1 ir 2 genotipo antikūnais prieš-norovirusą. Reakcijos eigoje mėginys reaguoja su dalelėmis dengtomis antikūnais prieš-norovirusą, susidaręs junginys membrana juda aukštyn reaguodamas su antikūnais prieš-norovirusą, 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.

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 reaguoja 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

Noroviruso tyrimas

Plokštelė dengta 1 ir 2 genotipo antikūnų prieš-norovirusą dalelėmis ir membrana dengta antikūnais prieš norovirusą.

Rotaviruso ir Adenoviruso tyrimas

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

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. Tyrimui nenaudoti pažeistos pakuotės.
5. Atliekant tyrimus būtina laikytis darbo su pavojingomis infekcijomis reikalavimų.
6. Tyrimo metu dėvėkite darbinis rūbus, pirštines, apsauginius akinius.
7. Utilizuojant laikytis bendros darbo laboratorijoje tvarkos.
8. Aplinkos drėgmė ir temperatūra gali įtakoti tyrimų rezultatus.
9. **Ekstraciniai tirpalai Noroviruso ir Rotaviruso/Adenoviruso tyrimams yra skirtingi.**

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Rinkinys gali būti laikomas kambario temperatūroje 2-30⁰ C temperatūroje. Tyrimo plokštelės stabilumas yra iki datos nurodytos ant pakuotės. Plokšteles išpakuokite tik prieš tyrimą. Negalima užšaldyti. Nenaudoti pasibaigusio galiojimo laiko reagentų.

ĖMINIŲ SURINKIMAS

- o Tyrimų surinkimui tinkamiausiai ėminiai rinkti esant ūmiems atvejais. Buvo nustatyta, kad tinkamiausi šiems tyrimams ėminiai surinkti 3-13 ūminės infekcijos dieną. Jei ėminiai surenkami vėliau ir dar pasibaigus diarėjai, tai surinkto ėminio sudėtyje gali būti per mažą rotaviruso koncentracija ir tyrimo rezultatas bus neigiamas.
- o Ėminiai turi būti surenkami į švarius, sausus, sandarius indelius be detergentų, stabilizatorių ar transportinių terpių.
- o Prieš naudojimą reagentai turi būti kambario temperatūros.

RINKINIO SUDĖTIS

- Tyrimo plokštelės
- Mėginių surinkimo indeliai su ekstrakciniu buferiu (Rota/Adeno tyrimams)
- Mėginių surinkimo indeliai su ekstrakciniu buferiu (Noro tyrimui)
- Lašintuvai
- Naudojimo instrukcija

TYRIMAMS PAPILDOMAI REIKALINGOS PRIEMONĖS

Mėginių surinkimo indeliai fekalijoms, atliekų konteineris, chronometras, 80µl pipetės

TYRIMO EIGA

Prieš tyrimą visi reagentai turi būti kambario temperatūros 15-30⁰ C.

1. Fekalijų 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 2-8⁰ C temperatūroje 3 dienas, jei laikysite ilgiau šaldykite tai -20⁰ C.

2. Mėginio paruošimas:

Pastaba: kiekvienas fekalijų ėminys turi būti ištirpintas 2 skirtinguose ekstrakciniuose tirpaluose, t.y. viename tirpale ištirpintos fekalijos skirtos Noroviruso nustatymui, kitame tirpale ištirpintos fekalijos skirtos Rota/Adeno virusų nustatymui.

a) kietos fekalijos: nuimkite mėgintuvėlio dangtelį ir paaimkite 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 perkeltkite apie 2 lašus (apie 50µl) fekalijų. Dangteliu uždenkite mėgintuvėlį ir viduje esantį skystį išmaišykite, taip paruošiamas skystas fekalijų mėginys. Palikite 3 minutes pastovėti.

3. Tyrimo plokštelę prieš tyrimą išpakuokite iš hermetinės pakuotės ir rekomenduojama panaudoti valandos laikotarpyje.

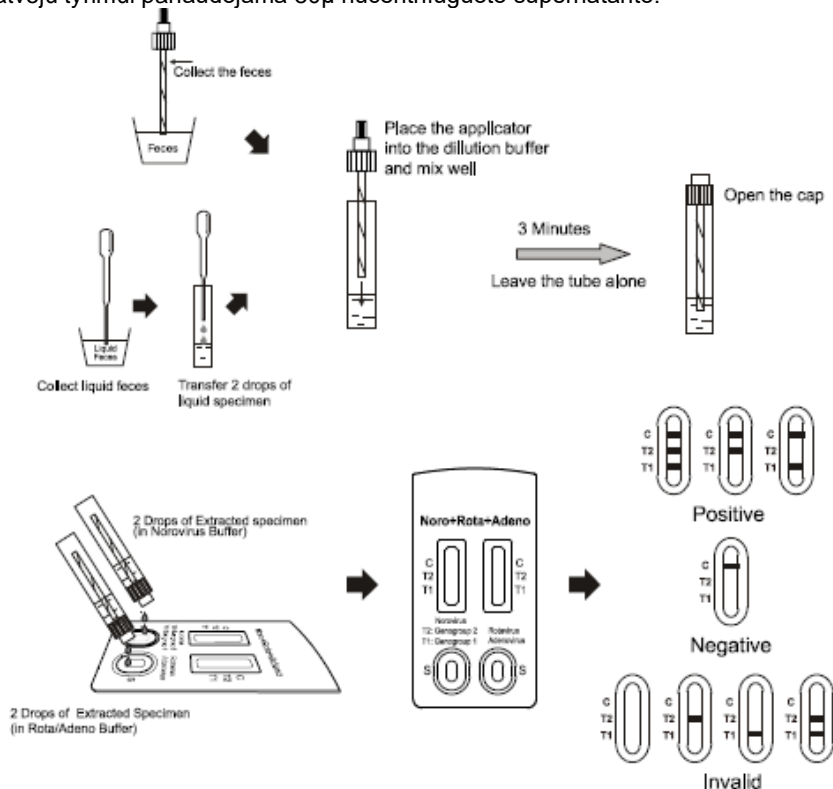
Plokštelė turi būti kambario temperatūros. Išpakuotą plokštelę rekomenduojama panaudoti iš karto išpakavus.

4. **Noroviruso tyrimas**: nuimkite ėminio surinkimo indelio dangtelį ir į Noro tyrimo plokštelėje esantį mėginio S zoną įlašinkite 2 lašus paruošto mėginio (80µl), venkite, kad nesusidarytu oro burbulai, fiksuokite reakcijos pradžią, žr. iliustraciją žemiau.

Rotaviruso/ Adenoviruso tyrimas: nuimkite ėminio surinkimo indelio dangtelį ir į Rota/Adeno tyrimo plokštelėje esantį mėginio S zoną įlašinkite 2 lašus paruošto mėginio (80µl), venkite, kad nesusidarytu oro burbulai, fiksuokite reakcijos pradžią, žr. iliustraciją žemiau.

5. Po 15 minučių įvertinkite reakcijos rezultatą. Praėjus 20 minučių rezultato nebegalima vertinti.

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



REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Noroviruso tyrimo zona plokštelėje

T1 ir T2 teigiami: atsiranda 3 aiškios spalvos linijos: viena – kontrolės linija (C), ir kitos dvi linijos, t.y. T1 ir T2.

T1 teigiamas: išryškėja 2 aiškios spalvos linijos: viena T1, t.y. genotipas 1 vertinimo zonoje, o kita kontrolės (C) zonoje

T2 teigiamas: išryškėja 2 aiškios spalvos linijos: viena T2, t.y. genotipas 2 vertinimo zonoje, o kita kontrolės (C) zonoje

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

Rota/Adeno tyrimo zona plokštelėje

Rotavirusas teigiamas - jei kontrolės zonoje (C) ir vertinimo zonoje (T2) atsiranda aiškios spalvotos juostelės.

Adenovirusas teigiamas - jei kontrolės zonoje (C) ir vertinimo zonoje (T1) atsiranda aiškios spalvotos juostelės.

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

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

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

Klaidingas : jei kontrolės zonoje ir/ar tyrimo zonoje spalvinio pasikeitimo nėra, tai rezultatas netinkamas vertinti. Tyrimą būtina pakartoti iš naujo. Pastebėjus pakartotinius nesklaidumus nebenaudokite to rinkinio ir praneškite gamintojui ar jo atstovui.

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 Noroviruso/ Rotaviruso/ Adenoviruso nustatymams. Jei norima vertinti virusų koncentraciją, tai reikia atlikti kiekybinius tyrimus.
- 2. Nustato Norovirusą/ Rotavirusą/ Adenovirusą fekalijose, vertinant galutinį rezultatą būtina įvertinti kitus tyrimus ir klinikinius duomenis.
- 3. Tiriant kūdikius iki vienerių metų galimi klaidingi teigiami rezultatai.
- 4. Gavus neigiamą rezultatą, o klinikiškai simptomams esant teigiamais būtina atlikti papildomus RT-PCR tyrimus. Neigiami greitųjų tyrimų rezultatai dar nepaneigia galimos virusų mažos koncentracijos.

LAUKIAMIEJI REZULTATAI

Tyrimų rezultatai naudojant šiuos rinkinius buvo palyginti su kitais komerciniais rinkiniais, rezultatų atitikimas 94,0%.

PAGRINDINĖS CHARAKTERISTIKOS

Klinikinis jautrumas, specifiškumas ir tikslumas

Norovirusas

Viso buvo ištirti vaikų ir jaunuolių 70 mėginiai, tyrimų rezultatai lyginti su rezultatais gautais tyrimams panaudojant RT-PCR metodą.

Tyrimo rezultatai parodė, kad santykinis šio tyrimo jautrumas 95,7%, o santykinis specifiškumas 91,7%.

Noroviruso nustatymas plokštelėje metodo palyginimas su RT-PCR metodu

Metodas		RT-PCR agliutinacija		Bendri rezultatai
Noroviruso nustatymas plokštelėje	Rezultatai	Teigiama	Neigiama	
	Teigiama	44	2	46
	Neigiama	2	22	24
Bendri rezultatai		46	24	70
Santykinis jautrumas: 95,7 % (95%CI: 85,2%–99,6%)				
Santykinis specifiškumas: 91,7% (95%CI: 73,00%–99,0%)				
Tikslumas: 94,3% (95%CI: 86,0%–98,4%)				

Rotavirusas

Viso buvo ištirti vaikų ir jaunuolių 501 mėginiai, tyrimų rezultatai lyginti su rezultatais gautais tyrimams panaudojant latekso agliutinacijos metodą.

Tyrimo rezultatai parodė, kad santykinis šio tyrimo jautrumas 97,3%, o santykinis specifiškumas 97,1%.

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%)				

Adenovirusas

Viso buvo ištirti vaikų ir jaunuolių 381 mėginiai, tyrimų rezultatai lyginti su rezultatais gautais tyrimams panaudojant latekso agliutinacijos metodą.

Tyrimo rezultatai parodė, kad santykinis šio tyrimo jautrumas 95,2%, o santykinis specifiškumas 97,7%.

Adenoviruso nustatymas plokštelėje metodo palyginimas su latekso agliutinacijos metodu

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 10 mėginių replikos: neigiamos, silpnai teigiamos, teigiamos, stipriai teigiamos. Rezultatai atitiko >99%.

TIKSLUMAS išorinis

Šiam tyrimui buvo naudoti 10 mėginių replikos: neigiamos, silpnai teigiamos, teigiamos, stipriai teigiamos. Rezultatai atitiko >99%.

KRYŽMINĖS REAKCIJOS

Buvo vertinti reakcijų aktyvumai 10x10⁹ organizmų/ml. Šių organizmų reakcijos su norovirusu fekacijose gavosi neigiamos:

Staphylococcus aureus
Pseudomonas aeruginosa
Enterococcus faecalis
Group C *Streptococcus*
Klebsiella pneumoniae
Branhamella catarrhalis
Candida albicans









Proteus mirabilis
Acinetobacter spp.
Salmonella choleraesuis
Gardnerella vaginalis
Acinetobacter calcoaceticus
E. coli
Chlamydia trachomatis

Neisseria gonorrhea
Group B *Streptococcus*
Proteus vulgaris
Enterococcus faecium
Hemophilus influenzae
Neisseria meningitidis

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. Microbiol. 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, 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