

Clostridium difficile GDH+A+B - kasetki

Szybki test immunochromatograficzny

do wykrywania antygenu GDH, toksyny A i toksyny B *Clostridium difficile* w kale

Tylko do diagnostyki in vitro

Nr kat. 1-327-K020 kasetki *Clostridium difficile* GDH+A+B (combo): 20 szt. + bufor ekstrakcyjny: 20 x 1,2 ml**ZASTOSOWANIE**

Clostridium difficile GDH+A+B jest immunochromatograficznym testem do jakościowego oznaczenia antygenu GDH, toksyny A i toksyny B *Clostridium difficile* w próbkach kału.

WSTĘP

Clostridium difficile (*C. difficile*) jest Gram-dodatnią, beztlenową, tworzącą formy przetrwalnikowe bakterią. Uznawana jest za główny czynnik etiologiczny biegunki i zapalenia jelita grubego.

Choroby wywoływane przez *C. difficile* rozwijają się, gdy bakteria może się namnażać w okrężnicy - najczęściej po kuracji antybiotykowej, powodującej naruszenie równowagi flory jelitowej. *Clostridium difficile* może uwalniać dwie toksyny: toksynę A oraz toksynę B, które wywołują objawy kliniczne: od lekkiej biegunki, przez rzekomobloniaste zapalenie jelita grubego, aż do toksycznego rozszerzenia okrężnicy, a nawet śmierci. Antygen GDH, czyli dehydrogenaza glutaminianowa *C. difficile*, jest enzymem produkowanym w dużych ilościach przez wszystkie szczepy - zarówno uwalniające toksyny jak i te, które toksyn nie uwalniają. Dzięki temu enzym ten jest doskonałym markerem diagnostycznym pozwalającym na wykrywanie *Clostridium difficile*.

ZASADA METODY

Clostridium difficile GDH jest szybkim immunochromatograficznym testem do jakościowego oznaczenia dehydrogenazy glutaminianowej (GDH), toksyny A i toksyny B *Clostridium difficile* w próbkach kału.

Na pasku do wykrywania antygenu GDH w rejonie testowym (T) membrany nitrocelulozowej immobilizowane są mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko antygenowi GDH. Powierzchnia, na którą nanosi się próbkę, nasycona jest roztworem testowym zawierającym mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko GDH sprzężone z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi oraz roztworem kontrolnym, w którego skład wchodzi specyficzne białko sprzężone z zielonymi cząstkami polistyrenowymi.

Na pasku do wykrywania toksyny A w rejonie testowym (T) membrany nitrocelulozowej immobilizowane są mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko toksynie A. Powierzchnia, na którą nanosi się próbkę, nasycona jest roztworem testowym zawierającym mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko toksynie A sprzężone z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi oraz roztworem kontrolnym, w którego skład wchodzi specyficzne białko sprzężone z zielonymi cząstkami polistyrenowymi.

Na pasku do wykrywania toksyny B w rejonie testowym (T) membrany nitrocelulozowej immobilizowane są mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko toksynie B. Powierzchnia, na którą nanosi się próbkę, nasycona jest roztworem testowym zawierającym mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko toksynie B sprzężone z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi oraz roztworem kontrolnym, w którego skład wchodzi specyficzne białko sprzężone z zielonymi cząstkami polistyrenowymi.

Na każdym pasku w rejonie kontrolnym (C) na membranie nitrocelulozowej immobilizowane są ponadto królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko specyficznemu białku, sprzężonemu z zielonymi cząstkami polistyrenowymi, wchodzącymi w skład roztworu kontrolnego.

Po naniesieniu próbki do studzienki próbkowej dochodzi do jej podsiąkania wzdłuż paska testowego dzięki siłom kapilarnym. Próbka wypłukuje nasycone na pasek roztwory: testowy i kontrolny. W przypadku próbek pozytywnych obecne w próbce antygeny (GDH, toksyna A i/lub toksyna B) wiążą się z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi za pośrednictwem odpowiednich, sprzężonych z nimi specyficznych przeciwciał. Po dotarciu do rejonu testowego (T) na membranie nitrocelulozowej, immobilizowane tam przeciwciała wiążą właściwe im antygeny (GDH, toks. A, toks. B), połączone wcześniej z przeciwciałami sprzężonymi z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi, dzięki czemu w rejonie testowym pojawia się czerwony prążek. Jeżeli próbka nie zawiera wykrywanego antygenu lub jego stężenie jest niższe niż limit detekcji testu, kompleksy czerwonych cząstek polistyrenowych nie są wiązane w żadnym rejonie membrany nitrocelulozowej i czerwony prążek testowy nie pojawia się.

Zarówno w przypadku próbek negatywnych, jak i pozytywnych, immobilizowane w rejonie kontrolnym membrany nitrocelulozowej przeciwciała przeciwko specyficznemu białku sprzężonemu z zielonymi cząstkami polistyrenowymi wiążą te kompleksy, w wyniku czego pojawia się zielony prążek kontrolny, będący wewnętrzną kontrolą testu. Świadczy on o prawidłowej objętości naniesionej próbki oraz o jej prawidłowym przepływie wzdłuż paska testowego.

SKŁAD ZESTAWU

Kasetki <i>Clostridium difficile</i> GDH+A+B	20 szt.
Aplikatory z buforem ekstrakcyjnym	20 szt.
Instrukcja	1 szt.

DODATKOWE MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE

(nie dostarczone w zestawie)

- Pojemnik do pobrania próbki
- Rękawice jednorazowe
- Zegarek lub minutnik

PRZECHOWYWANIE

Testy należy przechowywać w temp. 2-30°C. **Nie zamrażać!**

Prawidłowo przechowywane składniki zestawu w nienaruszonych opakowaniach jednostkowych zachowują trwałość do daty ważności podanej na opakowaniu.

Kasetki wyjmować z foliowych saszetek bezpośrednio przed użyciem.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

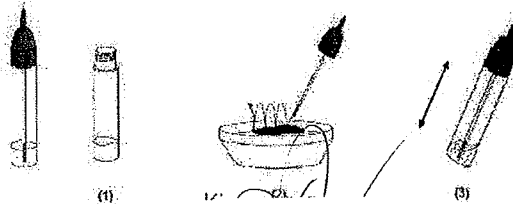
- Test jest przeznaczony tylko do profesjonalnej diagnostyki in vitro.
- Nie używać zestawu po przekroczeniu terminu ważności.
- Wszystkie badane próbki oraz zużyte testy należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny i utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami.
- Bufor ekstrakcyjny zawiera środki konserwujące. Należy unikać bezpośredniego kontaktu ze skórą i błonami śluzowymi.
- Nie używać poszczególnych składników testu z innych zestawów.
- Podczas pracy z testem zachować odpowiednie środki ostrożności, stosować odpowiednią odzież ochronną i rękawiczki jednorazowe. Nie jeść, nie pić i nie palić w obszarze wykonywania i przechowywania testów.

POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBKKI

Próbki kału powinny być pobrane do czystych pojemników. Próbki można przechowywać w temp. 2-8°C do 24 godzin przed badaniem. W przypadku konieczności dłuższego przechowywania próbki należy zamrozić w temp. -20°C. W przypadku próbek mrożonych przed dalszą obróbką należy je doprowadzić do temperatury pokojowej. Nie zaleca się ponownego zamrażania i rozmrażania próbek.

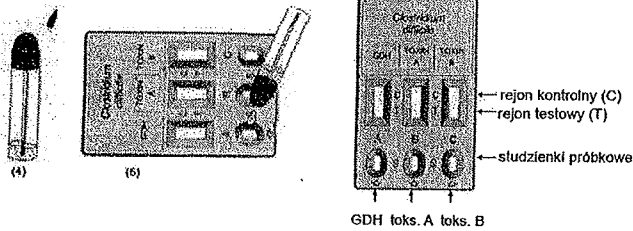
Przygotowanie próbki:

1. Odkręcić nakrętkę aplikatora z buforem ekstrakcyjnym (1) i zamocowanym na nakrętkę patyczkiem pobrać odpowiednią ilość próbki. Próbkę do analizy (ok. 125 mg) należy pobrać z czterech różnych miejsc próbki kału (2), a następnie przenieść ją do aplikatora wraz z patyczkiem. W przypadku próbek ciekłych należy pobrać około 125 µl próbki za pomocą pipety.
2. Aplikator szczelnie zamknąć. Potrząsać energicznie w celu zapewnienia prawidłowego rozprowadzenia kału (3).



WYKONANIE TESTU

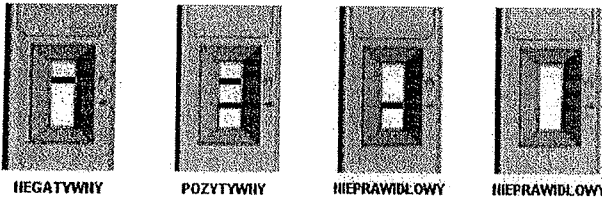
Przed rozpoczęciem analizy należy ogrzać kasetki i próbki do temp. pokojowej (15-30°C). Foliove opakowanie kasetki otwierać bezpośrednio przed wykonaniem badania.



- Wyjąć test z opakowania i położyć na czystej i równej powierzchni (badanie wykonać jak najszybciej po wyjęciu kasetki).
- Kilkakrotnie potrząsnąć aplikatorem z próbką zawieszoną w buforze ekstrakcyjnym.
- Odlamać końcówkę nakrętki (4) i nanieść po 4 krople próbki zawieszony w buforze do każdej studzienki próbkowej (5). Unikać nanoszenia cząstek stałych.
- Odczytać wynik testu w 10 minucie od naniesienia próbki. Nie należy interpretować wyniku testu po czasie dłuższym niż 10 minut.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Dla poszczególnych antygenów:



WYNIK NEGATYWNY: w okienku wyniku pojawia się tylko zielony prążek kontrolny.

WYNIK POZYTYWNY: w okienku wyniku pojawiają się dwa prążki: zielony prążek kontrolny oraz czerwony prążek testowy.

WYNIK NIEPRAWIDŁOWY: w okienku wyniku nie pojawia się zielony prążek kontrolny. Brak zielonego prążka kontrolnego oznacza wynik nieprawidłowy niezależnie od braku lub ewentualnej obecności czerwonego prążka testowego. Przyczyną takiego wyniku może być niedostateczna ilość próbki, niewłaściwa procedura wykonania testu lub pogorszeniem jakości odczynników. Test należy powtórzyć używając nowej kasetki. Jeśli nieprawidłowości będą się powtarzać, należy zaprzestać wykonywania analiz i skontaktować się z dystrybutorem.

Intensywność czerwonego prążka testowego może różnić się w zależności od stężenia badanego antygeny w próbce. Niemniej jednak wyniku testu nie należy na tej podstawie interpretować pod kątem ilościowym.

Dla całego testu:

GDH	Toks. A	Toks. B	Interpretacja wyniku
-	-	-	Brak antygeny GDH, toksyny A i toksyny B w badanej próbce. Nie ma infekcji wywołanej przez <i>C. difficile</i> .
+	+	+	Obecność antygeny GDH, toksyny A i toksyny B w badanej próbce. Infekcja wywołana przez <i>C. difficile</i> .
+	+	-	Obecność antygeny GDH i toksyny A w badanej próbce. Infekcja wywołana przez <i>C. difficile</i> .
+	-	+	Obecność antygeny GDH i toksyny B w badanej próbce. Infekcja wywołana przez <i>C. difficile</i> .
+	-	-	Obecność antygeny GDH w badanej próbce. Infekcja wywołana przez <i>C. difficile</i> .
-	+	+	W przypadku takiego wyniku test należy powtórzyć na świeżej próbce. Jeśli wynik się powtórzy, należy uznać, że próbka zawiera toksyny A i B.
-	+	-	W przypadku takiego wyniku test należy powtórzyć na świeżej próbce. Jeśli wynik się powtórzy, należy uznać, że próbka zawiera toksynę A.
-	-	+	W przypadku takiego wyniku test należy powtórzyć na świeżej próbce. Jeśli wynik się powtórzy, należy uznać, że próbka zawiera toksynę B.
Inny wynik			Wynik nieprawidłowy – należy powtórzyć oznaczenie na tej samej próbce z użyciem nowego testu. Jeżeli problem będzie się powtarzał, skontaktować się z dostawcą testu.

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Limit detekcji (czułość analityczna): 0,8 ng/ml dla antygeny GDH, 2 ng/ml dla toksyny A i 0,63 ng/ml dla toksyny B.

Czułość i specyficzność (diagnostyczna) (GDH): Oceny testu dokonano poprzez porównanie testu *Clostridium difficile* GDH+A+B z testem C. DIFF QUIK CHEK Complete, Techlab). Próbki zostały pobrane od pacjentów z biegunką. Próbki pozytywne zostały potwierdzone metodą ELISA. Uzyskano następujące wyniki:

	wynik	Test referencyjny (Techlab)		suma
		pozytywny	negatywny	
C. difficile GDH+A+B	pozytywny	26	0	26
	negatywny	0	48	48
suma		26	48	74

Względna czułość: > 99%

Względna swoistość: > 99%

PPV: > 99%

NPV: > 99%

Oceny testu dokonano również w oparciu o wyniki otrzymane metodą ELISA (Wampole™ C. Diff Check™-60, Techlab). Uzyskano następujące wyniki:

	wynik	Wampole™ C. Diff Check™-60		suma
		pozytywny	negatywny	
C. difficile GDH+A+B	pozytywny	39	0	39
	negatywny	2	47	49
suma		41	47	88

Względna czułość: > 95%

Względna swoistość: > 99%

PPV: > 99%

NPV: > 96%

Czułość i specyficzność (diagnostyczna) (toksyny A i B): Oceny testu dokonano poprzez porównanie testu *Clostridium difficile* GDH+A+B z testem C. DIFF QUIK CHEK Complete, Techlab). Próbki zostały pobrane od pacjentów z biegunką. Próbki pozytywne zostały potwierdzone metodą ELISA. Uzyskano następujące wyniki:

	wynik	Test referencyjny (Techlab)		suma
		pozytywny	negatywny	
C. difficile GDH+A+B	pozytywny	6	0	6
	negatywny	0	44	44
suma		6	44	50

Względna czułość: > 99%

Względna swoistość: > 99%

PPV: > 99%

NPV: > 99%

Reaktywność krzyżowa: Test poddano ocenie pod kątem reaktywności krzyżowej z innymi mikroorganizmami, które mogą być obecne w jelitach. Nie stwierdzono reakcji krzyżowych z następującymi patogenami:

Campylobacter coli, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*









OGRANICZENIA

- Nadmiar próbki może być przyczyną nieprawidłowych wyników (pojawiają się brązowe prążki). Należy rozcieńczyć próbkę i powtórzyć test.
- Intensywność prążków czerwonych w linii testowej może różnić się w zależności od stężenia wykrywanych antygenów w badanej próbce.
- Test *Clostridium difficile* GDH+A+B jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki kału ludzkiego. Jakość testu zależy od jakości próbki, dlatego należy pamiętać o właściwym pobieraniu próbki do badania.
- Wyniki pozytywne świadczą o obecności w badanej próbce antygeny GDH, toksyny A i/lub toksyny B. Infekcja może być potwierdzona wyłącznie przez lekarza na podstawie objawów klinicznych i dodatkowych badań laboratoryjnych.
- Wynik negatywny nie wyklucza w 100% infekcji *Clostridium difficile*, ponieważ stężenie wykrywanych antygenów w badanej może być niższe od limitu detekcji testu.

REFERENCJE

1. Wren, M. W. D, et al., Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. *British Journal of Biomedical Science*, 66 (1), 2009.
2. Vaishnavi, Ch., Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indican J. Med. Res.* 131, April 2010, pp 487-499.

STOSOWANE SYMBOLE GRAFICZNE - OBJAŚNIENIA:

-  - zawartość
-  - numer katalogowy
-  - przed użyciem zapoznać się z instrukcją
-  - wyrób do diagnostyki in vitro
-  - temperatura przechowywania
-  - producent
-  - numer serii
-  - data ważności