

Clostridium difficile GDH, toksyna A, B- kasetki

Szybki test immunochromatograficzny do wykrywania dehydrogenazy glutaminianowej oraz toksyn A i B *Clostridium difficile*.

Tylko do diagnostyki in vitro

Nr katalogowy 1-327-K020

Clostridium difficile GDH, toksyna A, B

Clostridium difficile jest immunochromatograficznym testem do jakościowego oznaczania toksyn A, B oraz dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) *Clostridium difficile* w próbkach kału. Test kasetkowy *Clostridium difficile* jest wysoko czułym, skriningowym oznaczeniem pozwalającym na określenie przypuszczalnej infekcji *Clostridium difficile*.

WSTĘP

Clostridium difficile (*C. difficile*) jest Gram-dodatnią, beztlenową, tworzącą formy przetrwalnikowe bakterią. *C. difficile* jest głównym czynnikiem etiologicznym biegunki i zapalenie jelita grubego. *C. difficile* jest przyczyną zachorowań u pacjentów hospitalizowanych. Choroby wywoływane przez *C. difficile* rozwijają się gdy bakteria może namnażać się w okrężnicy, najczęściej po kuracji antybiotykowej w przypadkach uszkodzenia flory jelitowej. *C. difficile* może uwalniać dwie toksyny tzn. toksynę A oraz toksynę B które odpowiedzialne są za występowanie objawów od lekkiej biegunki przez rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego do toksycznego rozszerzenia okrężnicy a nawet śmierci. Dehydrogenaza glutaminianowa *C. difficile* jest enzymem produkowanym w dużych ilościach przez wszystkie szczepy uwalniające toksyny jak i te, które toksyn nie uwalniają, dzięki czemu enzym ten jest doskonałym markerem diagnostycznym.

ZASADA TESTU

Pasek A zawiera membranę nitrocelulozową z immobilizowanymi mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko toksynie A w pozycji prążka testowego (T) oraz króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi przeciwko specyficznemu białku w pozycji prążka kontrolnego (C). Inna część paska, na którą nanosi się próbkę, nasączona jest roztworem kolorowego znacznika testowego (mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko toksynie A sprzężone z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi) oraz znacznika kontrolnego (specyficzne białko sprzężone z zielonymi cząstkami polistyrenowymi).

Pasek B zawiera analogiczne elementy z przeciwciałami przeciwko toksynie B zamiast przeciwciał przeciwko toksynie A.

Pasek C. Membrana testu jest opłaszczona w rejonie testowym (T) przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko GDH oraz przeciwciałami poliklonalnymi w rejonie kontrolnym (C) skierowanymi przeciwko specyficznemu białku. Powierzchnia na którą nanosi się próbkę, nasycona jest roztworem testowym zawierającym mysie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko GDH sprzężone z czerwonym lateksem polistyrenowym oraz roztworem kontrolnym w którego skład wchodzi specyficzne białko sprzężone z zielonymi cząsteczkami lateksu polistyrenowego.

Jeżeli próbka naniesiona na pasek A zawiera toksynę A, przeciwciała przeciwko toksynie A sprzężone z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi łączą się z toksyną A tworząc kompleksy, które migrują wzdłuż paska na skutek sił kapilarnych w kierunku prążka testowego (T) i kontrolnego (C). Po dotarciu do prążka testowego (T) przeciwciała przeciwko toksynie A immobilizowane na membranie nitrocelulozowej wiążą toksynę A połączoną za pośrednictwem innego przeciwciała z czerwonymi cząstkami polistyrenowymi, tworząc czerwono zabarwiony prążek testowy (T). Próbka migruje dalej w kierunku prążka kontrolnego (C), gdzie królicze przeciwciała przeciwko specyficznemu białku immobilizowane na membranie nitrocelulozowej wiążą znacznik kontrolny (specyficzne białko sprzężone z zielonymi cząstkami polistyrenowymi), tworząc zielono zabarwiony prążek kontrolny (C).

Jeśli badana próbka nie zawiera toksyny A, znacznik testowy nie jest wiązany przez przeciwciała immobilizowane w pozycji prążka testowego (T) i w związku z tym na pasku pojawia się tylko zielono zabarwiony prążek kontrolny (C). W analogiczny sposób, ale z udziałem toksyny B lub GDH i skierowanych przeciwko niej przeciwciał, przebiega reakcja na pasku B bądź C. Niezależnie od tego, czy badana próbka jest pozytywna, czy negatywna, na paskach A, B i C powinny zawsze pojawić się zielone paski kontrolne (C). Są one potwierdzeniem, że na test naniesiono wystarczającą objętość próbki i że nastąpiła prawidłowa migracja próbki wzdłuż paska testowego.

PRZECHOWYWANIE

Zamknięte kasetki należy przechowywać w temperaturze 2-30°C. Test jest stabilny do daty nadrukowanej na opakowaniu. Test należy przechowywać oryginalnym opakowaniu do momentu użycia. Nie zamrażać.

OSTRZEŻENIA

Wyłącznie do diagnostyki in vitro

Nie używać po przekroczeniu daty ważności

Wszystkie próbki powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne. Do każdej próbki należy stosować nowy test aby zapobiec kontaminacji.

Zużyte testy należy utylizować zgodnie z przepisami.

Odczynniki zawierają konserwanty, należy unikać kontaktu ze skórą i błonami śluzowymi.

Należy używać wyłącznie składników zestawu dostarczonego wraz z testem.

Należy postępować zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej, Używać odzieży ochronnej, rękawiczek jednorazowych, okularów ochronnych i masek. Nie należy spożywać posiłków oraz płynów w obszarze pracy z testem.

POSTĘPOWANIE Z POBRANĄ PRÓBKĄ

Przechowywanie:

Próbki kału powinny być pobrane do czystych pojemników. Próbki mogą być przechowywane w temperaturze (2-8°C) przez 24 godziny. W przypadku konieczności dłuższego przechowywania próbki należy przechowywać w temperaturze -20°C. W przypadku próbek mrożonych powinny być one doprowadzone do temperatury pokojowej. Nie zaleca się ponownego zamrażania i rozmrażania próbek.

Pobranie:

- Należy odkręcić korek z fiolki (1) i użyć patyczka w celu pobrania odpowiedniej ilości próbki. Próbkę do analizy (ok. 125mg) należy pobrać z czterech różnych miejsc próbki kału (2) a następnie przenieść ją do fiolki wraz z patyczkiem. Fiolkę szczelnie zamknąć. W przypadku próbek ciekłych należy pobrać około 125 µl próbki za pomocą pipety.
- Fiolkę szczelnie zamknąć. Potrząsać pojemnikiem z buforem w celu zapewnienia prawidłowego rozprowadzenia kału (3).

Materiały dostarczone: kasety testowe, instrukcja, fiolki do pobrania próbki kału (zestaw przewidziany na 20 oznaczeń)

Materiały wymagane ale niedostarczone: pojemnik na kał, rękawiczki jednorazowe, stoper



PROCEDURA

Przed rozpoczęciem analizy należy pozostawić kasety i pobrane próbki do osiągnięcia temperatury pokojowej (15-30°C). Nie otwierać opakowania kasety przed rozpoczęciem procedury.

- Potrząsać pojemnikiem z buforem w celu zapewnienia prawidłowego rozprowadzenia kału.
- Wyjąć kasetę testową z opakowania tuż przed rozpoczęciem nanoszenia próbki.
- Odstąpić końcówkę korka (4) i nanieść 4 krople na każdy okrągły dołek kasetki. Unikać nanoszenia cząstek stałych.
- Odczytać wynik testu w 10 minut. Nie należy interpretować wyniku testu po czasie dłuższym niż **10 minut**.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

	Toksyna A	Toksyna B	GDH	Interpretacja
1	-	-	-	Brak obecności w próbce toksyn A, B oraz antygeny GDH
Prążek	Zielony	Zielony	Zielony	
2	+	+	+	Obecność w próbce toksyn A, B oraz antygeny GDH
Prążek	Czerwony	Czerwony	Czerwony	
3	+	-	-	Obecność w próbce toksyny A
Prążek	Czerwony	Zielony	Zielony	
4	+	+	-	Obecność w próbce oraz toksyn A, B
Prążek	Czerwony	Czerwony	Zielony	
5	-	+	-	Obecność w próbce toksyny B

Prążek	Zielony	Czerwony	Zielony	Obecność w próbce antygenu GDH
6	-	-	+	
Prążek	Zielony	Zielony	Czerwony	Obecność w próbce antygenu GDH oraz toksyny B
7	-	+	+	
Prążek	Zielony	Czerwony	Czerwony	Obecność w próbce antygenu GDH oraz toksyny A
8	+	-	+	
Prążek	Czerwony	Zielony	Czerwony	

UWAGI

Intensywność czerwonego prążka w linii testowej (T) może różnić się w zależności od stężenia toksyn bądź antygenu w próbce. Nie należy interpretować wyniku testu pod kontem ilościowym.

Brak zielonych kontrolnych prążków świadczy o nieprawidłowym wykonaniu testu i taki wynik nie może być wykorzystany w procesie diagnostycznym.

KONTROLA JAKOŚCI

Wewnętrzna kontrola jakości jest zawarta w teście. Zielony prążek pojawiający się w linii kontrolnej (C) stanowi wewnętrzną kontrolę a jego pojawienie się świadczy o odpowiedniej objętości próbki oraz prawidłowym wykonaniu testu.

Czułość analityczna (limit detekcji)

Limit detekcji dla testu *Clostridium difficile* wynosi:

toksyna A – 2 ng/ml

toksyna B – 0.63 ng/ml

GDH - 0.8 ng/ml

Czułość testu GDH

Test <i>Clostridium difficile</i> GDH toksyna A+B vs C. DIFF QUIK CHEK Complete	Czułość	Specyficzność	PPV	NPV
	>99%	>99%	>99%	>99%

Czułość testu toksyna A+B

Test <i>Clostridium difficile</i> GDH toksyna A+B vs C. DIFF QUIK CHEK Complete	Czułość	Specyficzność	PPV	NPV
	>99%	>99%	>99%	>99%

OGRANICZENIA

- Nadmiar próbki może powodować nieprawidłowe wyniki (pojawiają się brązowe prążki). Należy rozcieńczyć próbkę i powtórzyć test.
- Intensywność prążka czerwonego w linii testowej może różnić się w zależności od stężenia antygenu w próbce.
- Test *Clostridium difficile* powinien być stosowany wyłącznie do diagnostyki kału ludzkiego. Jakość testu jest uwarunkowana jakością próbki dlatego należy pamiętać o właściwym pobieraniu próbki do badania.
- Wynik negatywny nie przesądza o tym, że infekcja nie wystąpiła ponieważ stężenie antygenu lub toksyn może być niższe od limitu detekcji testu.

Przeprowadzono ocenę testu pod kontem reakcji krzyżowych. Nie stwierdzono reakcji krzyżowych z niżej wymienionymi 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*

