

## Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B

**KATALOGOVÉ ČÍSLO: PL.3002 (20 testů)**

### ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B je jednoduchý, rychlý imunologický test pro kvalitativní simultánní detekci toxinu A a toxinu B ve vzorku stolice. Tento test se používá jako pomoc při diagnostice onemocnění spojených s *C. difficile* a výsledky testu by měly být posuzovány ve spojení s historií pacienta. Test je určen pouze pro diagnostické *in-vitro* použití.

### SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

*Clostridium difficile* je anaerobní, G+ sporulující tyčinka. Ačkoli je většina izolovaných kmenů netoxikogenních, některé kmeny toxin produkovat mohou. Nejdůležitějšími toxiny je toxin A a toxin B. Toxin A je enterotoxin a toxin B je cytotoxin. Tyto toxiny způsobují vodnaté průjemy a mohou způsobit pseudomembranózní kolitidu za přítomnosti širokospektrých antibiotik a dalších činidel. Riziko výskytu se zvyšuje s věkem, slabým imunitním systémem a délkou hospitalizace. *C. difficile* produkuje spóry, které jsou velmi rezistentní a jsou schopny snadno přežít v okolním prostředí. K přenosu dochází přímým kontaktem, kontaminovanými rukama nebo předměty. Jako takové je *C. difficile* nejběžněji identifikovanou příčinou nozokomiálních průjmů u dospělých. Infekce *C. difficile* (CDI) jsou klasifikovány ve dvou skupinách podle jejich síly: postantibiotický průjem a pseudomembranózní kolitida (PMC). PMC reprezentuje 7-9% CDI. PMC se obvykle na začátku projevuje vodnatým průjmem provázeným horečkou a bolestí v oblasti břicha. Pseudomembranózní léze jsou při endoskopickém vyšetření viditelné. Mortalita způsobená infekcí *C. difficile* se pohybuje od 0,6 do 1,5%, ale může dosáhnout až procentuální výše 30-50%. V roce 1995 Riegler a spol. zkoumali vliv každého toxinu na lidské střevo. Jejich publikovaná data ukazují, že lidské střevo je asi 10x citlivější k poškození vlivem toxinu B než toxinu A. Toto naznačuje, že toxin B je důležitější než toxin A u patogeneze *C. difficile* kolitid.

V roce 2002 byl objeven epidemický typ toxinu III NAP1/027 kmen, který produkuje vysoké hladiny většinou virulentních faktorů toxinu A a toxinu B. Práce Lyrase a spol. pomohla zjištění, že toxin B, ne toxin A, je základem virulence. Cytotoxická schopnost toxinu B je díky jeho glykosylujícímu působení na RhoA.

### PRINCIP TESTU

Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B byl vyvinut jako rychlý imunologický test s laterálním průtokem určený k detekci přítomnosti antigenu toxinu A, a toxinu B ve vzorku čerstvé, zmrazené a v médiu uchované stolice.

Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B obsahuje protilátky toxinu A a toxinu B nakoutované na linii v detekční oblasti nitrocelulóзовého prostoru testovacího stripu a anti-species specifické protilátky koutované na kontrolní linii v kontrolní oblasti. Protilátky anti-toxinu A a anti-toxinu B jsou také konjugovány s červenými latexovými částicemi a usušeny na inertním skelném vlákne, které je vloženo do testovacího stripu pod nitrocelulóзовým prostorem. Toxin A a toxin B přítomný ve vzorku se slučuje s protilátkou/červenou částicí a vytváří komplex. Díky migraci komplexu nitrocelulóзовým stripem směrem nahoru dochází k navázání na protilátky v detekční oblasti za vzniku viditelného růžového/červeného pásku.

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

Přebytečný konjugát zformuje druhý růžový/červený pásek. V kontrolní oblasti testovacího zařízení. Kontrolní linie by se měla objevit jako viditelný růžový/červený pásek v kontrolní oblasti zařízení vždy, aby indikovala, že testovací zařízení funguje správně.

### DODÁVANÝ MATERIÁL

- PL.3201, testovací zařízení: 20 kusů
- PL.3202, *C. difficile* Toxin A/B ředící pufr: 20 ml pufrovaného roztoku, který obsahuje smáčedlo a konzervační prostředky
- Návod k použití

### POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ KITU

- Stopky
- Testovací zkumavka pro přípravu vzorku
- Pipeta

### STABILITA A SKLADOVÁNÍ

- Činidla by měla být uchovávána při teplotě 2-30 °C až do data expirace uvedeném na štítku.
- Otevírejte až těsně před použitím, protože test je citlivý na vlhkost a teplo.
- Nezmrazujte.
- Soupravu nepoužívejte po datu expirace.
- Láhve je třeba uzavírat po každém použití a uchovávat je společně s ostatními komponentami v krabici. Po prvním otevření je pufr stabilní až do data expirace uvedeném na láhvi.

### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku.
- Pouze pro odborné, profesionální použití.
- Před prvním použitím je třeba si přečíst návod k použití.
- Testovací zařízení jsou určena k jednorázovému použití, nepoužívejte opakovaně.
- Dodávaná činidla mají potřebnou pracovní koncentraci. Činidla neřed'te.
- Nezaměňujte činidla mezi jednotlivými soupravami s různými čísly šarží.
- Nepoužívejte soupravu nebo činidla po jejich datu expirace.
- Mikrobiální kontaminace činidel může snížit přesnost testu.
- Zacházejte s veškerým materiálem jako s potencionálně infekčním, veškerý materiál likvidujte dle místních nařízen. Tekutý odpad by měl být likvidován 1% roztokem chlornanu sodného nebo dle místních požadavků na likvidaci infekčního materiálu.
- Roztok ředícího pufru obsahuje < 1% azidu sodného. Azid sodný je toxický po požití, vytváří potencionálně výbušné směsi mědi a olova v kanalizačním potrubí.
- Pokud dojde ke kontaktu činidel s mědí nebo olovem odpadní kanalizace, spláchněte odpad v kanalizačním potrubí velkým množstvím vody, abyste zamezili tvorbě potencionálně výbušných směsí.
- Před testováním vzorky nekonzentrujte.
- Vzorky stolice konzervované PVA (polyvinylalkohol) fixačním prostředkem nejsou pro provedení testu vhodné.

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

## SKLADOVÁNÍ A ODBĚR VZORKU

Pro Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B test mohou být použity vzorky odebrané pro rutinní vyšetření. Vzorky stolice by měly být odebírány do čistých, těsnících plastických nádobek.

- Čerstvá, nekonzervovaná stolice by měla být uchovávána při 2-8 °C a testována do 48 hodin od chvíle odběru.
- Pokud čerstvá stolice nebude do 48 hodin po odběru otestována, vzorky by měly být uchovávány při teplotě -20 °C nebo teplotě nižší a testovány do 2 měsíců od chvíle odběru. Vyvarujte se opakovanému zmrazení - rozmrazení vzorku.
- Vzorek stolice odebraný do Cary-Blair média by měl být uchován v chladničce (2-8 °C) a otestován do 1 týdne od chvíle odběru nebo skladován při -20 °C nebo teplotě nižší a otestován do 2 měsíců od chvíle odběru. Vyvarujte se opakovanému zmrazení - rozmrazení vzorku.
- Vzorky stolice, které byly zakoncentrovány nebo ošetřeny fixačním prostředkem PVA, nejsou pro provedení tohoto testu vhodné.

## PROTOKOL TESTU

1. Ujistěte se, že *C. difficile* Toxin A/B ředící pufr má pokojovou teplotu (15-30 °C). Před použitím jemně promíchejte.
2. Příprava vzorku:
  - a. Vzorek stolice musí mít před testováním pokojovou teplotu.
  - b. Vzorek promíchejte.
3. Vyjměte požadovaný počet testovacích zařízení z jejich obalů a položte je na čistý a rovný povrch.
4. Každé testovací zařízení označte číslem vzorku.
5. Označte také testovací zkumavky a vložte je do stojánku na zkumavky.
6. Do každé zkumavky přidejte 0,750 ml *C. difficile* Toxin A/B ředícího pufru.
7. Přidání vzorku:
  - a. Pokud je vzorek tekutý, použijte pipetu na jedno použití (Pasteurovu pipetu) a přeneste 50 µl vzorku do zkumavky s pufrem. Pipetu držte vertikálně a požadované množství vpust'ete do testovací zkumavky.
  - b. Pokud je vzorek hustý, přidejte malé množství stolice (přibližně o průměru 3 mm) do testovací zkumavky.
  - c. U vzorků, které jsou uchovávány v Cary-Blair médiu nebo C&S transportním médiu, přidejte 100 µl vzorku do testovací zkumavky.
8. Použijte stejnou pipetu a vzorek promíchejte s pufrem.
9. Přeneste 150 µl naředěného vzorku do vstupní zdičky pro vzorek na testovacím zařízení. Pipetu držte vertikálně nad vstupní zdičkou; opatrně přidávejte pufrovaný vzorek po kapkách. Čas testu měřte od této chvíle.
10. Výsledky testu odečítejte okamžitě po ukončení 15ti minutové inkubace. Výsledky neodečítejte po 15 minutách, mohou být nepřesné.

## KONTROLA KVALITY

Doporučuje se používat pozitivní i negativní kontrolu, abyste se ujistili, že test pracuje tak, jak je předpokládáno.

Kontrolní linie (C) je procedurální kontrola a dokazuje, že test funguje správně; průtok je správný, a že testovací činidla pracují tak, jak je předpokládáno. Když se na kontrolní linii objeví červený/růžový

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

pásek, znamená to, že zařízení pracuje správně. Kontrolní linie se objeví u všech validních testů, ať je nebo není vzorek reaktivní (viz výsledky testu a oddíl interpretace). Na membráně se může objevit hnědá barva. Tato barva nemá žádný vliv na odečítání testu.

## INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### POZITIVNÍ

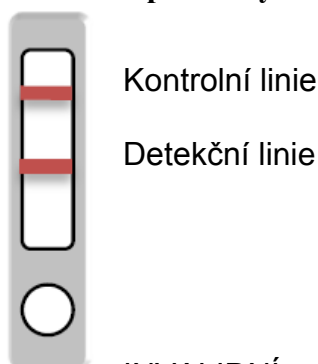
V okénku zařízení se objeví dva růžové/červené pásy jakékoli intenzity; na detekční linii a na kontrolní linii. Toto indikuje reaktivní výsledek, který se interpretuje jako pozitivní na Toxin A/B

*C. difficile.*

### NEGATIVNÍ

V okénku zařízení se objeví jeden růžový/červený pásek jakékoli intenzity; na kontrolní linii. Na detekční linii není žádný pásek. Toto indikuje nereaktivní výsledek, který se interpretuje jako negativní na Toxin A/B *C. difficile.*

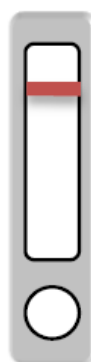
### Zobrazení positivity



Kontrolní linie

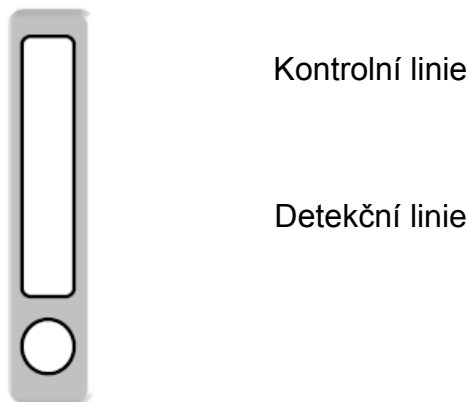
Detekční linie

### Zobrazení negativity



### INVALIDNÍ

V okénku zařízení se neobjeví růžový/červený pásek na kontrolní linii. Toto je invalidní výsledek a nemůže být interpretován. Invalidní bez ohledu na to, zda se v okénku zařízení objeví nebo neobjeví růžový/červený pásek na detekční linii. Pokud se vyskytne jedna ze situací níže, test by měl být opakován s novým testovacím zařízením.



Kontrolní linie

Detekční linie



Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

## LIMITACE PROCEDURY

1. Abyste obdrželi přesné výsledky, musí být Proflo<sup>TM</sup> *C. difficile* Toxin A/B používán dle instrukcí v tomto návodu k použití.
2. Pozitivní výsledek nevylučuje přítomnost dalšího infekčního patogenu.
3. Negativní výsledek nevylučuje možnost přítomnosti toxinu A/B *C. difficile* a může se stát, že hladina toxinu ve vzorku je pod detekovatelnou mezí testu. Korelace mezi množstvím toxinu ve vzorku a klinickou přítomností nebyla publikována.
4. Proflo<sup>TM</sup> *C. difficile* Toxin A/B detekuje toxin A a toxin B ve vzorcích stolice. Test není možné používat k odvození vztahu mezi intenzitou specifických viditelných vazeb a výskytem nebo silou klinických symptomů.
5. Získané výsledky jsou pouze pomůckou při stanovení diagnózy. Všechny in vitro diagnostické testy musí být vždy interpretovány kliniky v kombinaci s klinickým zhodnocením, lékařskou historií a/nebo dalšími laboratorními výsledky, aby byla stanovena správná diagnóza pacienta.
6. Používejte pouze tekuté frakce vzorku; vyvarujte se jakýmkoli velkým kusům nerozpustné stolice. Nadměrné množství částic může způsobit ucpání zdířky na vzorek.
7. Odečty výsledků před nebo po uplynutí 15 minut mohou být nesprávné.
8. Správný odběr vzorku a jeho zpracování je základem k dosažení optimální výkonnosti testu.
9. Vzorky stolice, které byly zakoncentrovány nebo ošetřeny PVA fixačním prostředkem nejsou vhodnými vzorky pro provedení tohoto testu.

## PROVÁDĚCÍ CHARAKTERISTIKY

Výkonnost Proflo<sup>TM</sup> *C. difficile* Toxin A/B byla vyhodnocena na 282 retrospektivních vzorcích stolice v klinické laboratoři a u výrobce.

Klinická senzitivita a specifická

Senzitivita a specifická testu byla porovnána s komerčně dostupnými EIA testy na retrospektivních vzorcích, jak je uvedeno v následující tabulce.

Proflo <sup>TM</sup> <i>C. difficile</i> Toxin A/B	<i>C. difficile</i> Toxin A/B EIA	
	+	-
+	112	1
-	15	154

Senzitivita: 88% (112/127) 95%CI 81-93%

Specifická: 99% (153/154) 95%CI 96-100%

## POROVNÁNÍ

Proflo<sup>TM</sup> *C. difficile* Toxin A/B byl porovnán s komerčně dostupnými imunologickými testy s laterálním průtokem na 282 retrospektivních vzorcích stolice. Procento shodnosti Proflo<sup>TM</sup>

*C. difficile* Toxin A/B versus komerčně dostupné porovnávané zařízení je následující:

Proflo <sup>TM</sup> <i>C. difficile</i> Toxin A/B	Porovnávané zařízení	
	+	-
+	105	7
-	12	158
Celkem	118	162

Celková shoda: 93,3%

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

Očekávané výsledky

Analytická senzitivita

Detekční limit byl determinován přidáním purifikovaného toxinu A a toxinu B *Clostridium difficile* separátně do jak pufru, tak humánních vzorků stolice. Vzorky byly naředěny v sérii a 5 replikátů z každého ředění bylo testováno Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B testem, aby byla determinována koncentrace, kterou produkuje pozitivní výsledek. Detekční limit 1 ng/ml pro toxin B a 20 ng/ml pro toxin A byl potvrzen testováním dalších 20 replikátů, každého pomocí Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B testu.

### KŘÍŽOVÁ REAKCE

Nebyla pozorována žádná křížová reakce ani u pozitivních ani u negativních vzorků, které obsahovaly následující organismy:

*Adenovirus serotype 3*

*Adenovirus serotype 7*

*Adenovirus serotype 40*

*Bacillus cereus*

*Bacteroides fragilis*

*Candida albicans*

*Clostridium histolyticum*

*Clostridium methylpentosum*

*Clostridium paraputrificum*

*Clostridium orbiscindens*

*Clostridium spiroforme*

*Clostridium bifirmantans*

*Clostridium haemolyticum*

*Campylobacter coli*

*Enterococcus faecalis*

*Echovirus 20*

*Giardia lamblia*

*Klebsiella oxytoca*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Shigella flexneri*

*Staphylococcus epidermidis*

*Yersinia bercovieri*

*Adenovirus serotype 5*

*Adenovirus serotype 41*

*Aeromonas hydrophila*

*Bacillus subtilis*

*Coxsackievirus*

*Clostridium novyi*

*Clostridium perfringens*

*Clostridium paraputrificum*

*Clostridium sordelli*

*Clostridium sporogenes*

*Clostridium chauvoei*

*Cryptosporidium parvum*

*Coronavirus OC43*

*Escherichia coli*

*Enterobacter cloacae*

*Helicobacter pylori*

*Proteus penneri*

*Serratia liquefaciens*

*Staphylococcus aureus*

*Vibrio cholera*

### Interferující substance

Analytická specifita testu byla determinována ze vzorků stolice, které obsahovaly potencionálně interferující substance v klinicky relevantních koncentracích. Respektive do negativních i pozitivních vzorků byly přidány směsi v lékařsky relevantní dávce (příměsí). Veškeré obohacené vzorky, včetně neobohacených (bez příměsí) pozitivních a neobohacených (bez příměsí) negativních vzorků, byly testovány napříč mnoha vzorky pomocí Proflow™ *C. difficile* Toxin A/B testu.

Testovány byly následující příměsí:

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)











Humánní krev (5% v/v), Mucin (3,5% w/v), Tuk stolice (stearová kyselina 5% w/v), Pepto-bismol (bizmut) (5% v/v), Imodium A-D (Loperamide HCl) (5% v/v), Kaopectate (attapulgit) (5% v/v), Vancomycin (0.25% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Síran barnatý (5% w/v), Uhličitan vápenatý (5% w/v). Neobjevila se žádná interference žádné příměsi při koncentracích uvedených výše. Interference byla pozorována u humánní plné krve při koncentraci vyšší než 10% v/v. Pokud je přítomna krev v koncentraci vyšší než 10% v/v, může být pozorován vznik falešně pozitivních výsledků.

## REPRODUKOVATELNOST

Test reprodukovatelnosti byl proveden na 6 slepých vzorcích (různé pozitivní a negativní vzorky) dvěma pracovníky, dvakrát denně, u každého pracovníka po dobu 5 dnů (60 replikací). 100% vzorků testovaných na přítomnost *C. difficile* poskytlo očekávané výsledky.

## LITERATURA

- Forster, A. J., Taljaard, M., Oake, N., Wilson, K., Roth, V. and C. van Walraven. The effect of hospital-acquired infection with *Clostridium difficile* on length of stay in hospital. *Can Med Assoc Jour.* 2012 January 10; 184(1): 37–42.
- Mc Donald, L. C., Owings, M., and Jernigan, D. B. *Clostridium difficile* Infection in Patients Discharged from US Short-stay Hospitals, 1996–2003. *Emerg Infect Dis.* 2006 March; 12(3): 409–415.
- Lyerly, D. M., H. C. Krivan, and T. D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 1-18.
- Riegler M, *et al.* *The Journal of Clinical Investigation* 1995, 95(5):2004-2011
- Lyras D, *et al.* *Nature* 2009, 458(7242):1176-1179
- Fenner L *et al* (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46 (1). 328-330.
- Barbut F., and JC. Petit. (2001). *Clin Microbiol Infect.* 7 (8). 405-410
- Shea-idsa guideline. Cohen S.H.; *Gerding D.N., Johnson S., Kelly C.P., Loo V.G., McDonald L.C., Pepin J., Wilcox M.H.* (2010). *Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) Infection control and hospital epidemiology.* 31 (5)
- Eastwood K., *et al* (2009). *J. Clin. Microbiol.* 47(10). 3211-3217.
- Crobach M.J.T, *et al* (2009). *Clin Microbiol Infect.* 15. 1053–1066.
- Just I *et al.* *Nature* 1995, 375(6531):500-503

	Použitelné do		Obsah dostačuje pro <n> testů
	Číslo šarže		Pro použití in vitro
	Varování		Rozmezí teplot
	Katalogové číslo		Viz návod k použití
	Zplnomocněný zástupce		Výrobce

Poslední revize: 2013/9



UK – \*44 (0)151 353 1613, Fax \*44 (0)151 353 1614, 3 Bassendale Road, Bromborough, Merseyside. CH62 3Q

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)