

Toxiny A a B

Rychlý enzymatický imunotest pro detekci toxinů A a B Clostridia difficile ve vzorcích stolice

REF katalogové číslo 712050

IVD zdravotnický prostředek in vitro

PŘEDPOKLÁDANÉ POUŽITÍ

ImmunoCard® Toxin A a B je rychlý, kvalitativní, na horizontálním proudění založený enzymatický imunotest (EIA) určený k detekci toxinů A a B Clostridia difficile v lidské stolici. Test se používá jako pomůcka při určování diagnózy onemocnění způsobených C. difficile.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ TESTU

Toxigenní Clostridium difficile je nejdůležitější příčinou nosokomiálního infekčního průjmu ve vyspělých státech. Jen v amerických nemocnicích se odhaduje asi 300 000 případů onemocnění vyvolaného C. difficile (CDAD) ročně. Clostridium difficile je etiologický faktor u asi 25% všech případů průjmu vyvolaného antibiotiky. Prakticky jakékoliv antibiotikum může pacienta učinit náchylným k CDAD. Klinický obraz se může u CDAD lišit od asymptomatické kolonizace až k životu ohrožující pseudomembránové kolitidě a toxickému megacolonu. Většina patogenních kmenů C. difficile produkuje dva biologicky a imunologicky odlišné toxiny: toxin A (enterotoxin) a toxin B (cytotoxin). Toxin A se dříve považoval za odpovědný za většinu patologických jevů u lidského CDAD, dokud se v devadesátých letech 20. století nezačaly objevovat zprávy o klinicky relevantním onemocnění způsobeném kmeny C. difficile, které produkují jen toxin B. Nejpřesnější analýza pro detekci C. difficile je cytotoxinový test, metoda však vyžaduje vybavení pro tkáňové kultury, 48-72 hodinovou inkubaci a není standardizovaná. Použití rychlého testu jakým je ImmunoCard Toxiny A a B umožňuje lékařovi potvrdit onemocnění rychle, zahájit správnou léčbu a zavést příslušná izolační opatření v budovách nemocnice.

PRINCIP TESTU

Test ImmunoCard Toxiny A a B se skládá z membrány upevněné v plastovém rámečku se dvěma políčky pro vzorky a dvěma políčky pro reakce. Membrána nese imobilizované protilátky proti toxinům A a B. Enzymový konjugát sestává z protilátek proti toxinům A a B navázaným na peroxidázu křenu selského. K provedení testu se stolice pacienta naředí roztokem pro ředění vzorku a inkubuje se pět minut s enzymovým konjugátem. Pokud jsou ve vzorku přítomné molekuly toxinů, naváží se během inkubace na příslušné protilátky vázané konjugátem. Po inkubaci se alikvotní část směsi přidá do obou políček pro vzorky a proběhne další pětiminutová inkubace při 20-26° C. Během druhé inkubace se komplex konjugát-toxin separuje od podkladu, když kapalná část vzorku proudí přes membránu do reakčních políček TEST a KONTROLA. Komplexy konjugát-toxin se zachytí v políčku TEST pomocí imobilizovaných antitoxinů v reakční membráně (druhé z reakčních políček slouží jako vnitřní kontrola). Obě políčka se následně promývají promývacím činidlem, aby

se omezila interference kontaminujících proteinů před přidáním substrátu. Reakční políčka se inkubují dalších 5 minut, během nichž je substrát modifikován enzymovým konjugátem. Výsledkem je vznik modrého zbarvení. Reakce se odečítají vizuálně. Vznik modrého zbarvení indikuje pozitivní test. V kontrolním políčku se protilátky proti toxinům konjugátu vážou přímo na imobilizovaný toxin. Modré zbarvení v kontrolním políčku znamená, že byl přidán vzorek, reagentie byly při použití aktivní a proběhla správná migrace vzorku.

REAGENCIE:

Testovací karta ImmunoCard Toxiny A a B: membrána upevněná v plastovém rámu a uzavřená v sáčku s vysušovačem. Destička nese imobilizované monoklonální protilátky proti toxinu A a kozí polyklonální protilátky proti toxinu B v políčku TEST a toxin C. difficile v políčku KONTROLA. Karty skladujte při teplotě 2-8°C.

Roztok pro ředění vzorku (Sample Diluent): pufrovaný proteinový roztok obsahující thimerosal (0,02%) jako konzervační prostředek. Skladujte při 2-8°C.

Pozitivní kontrola (Positive Control): Inaktivní nezpracovaný toxin C. difficile v pufrovaném roztoku obsahujícím thimerosal (0,02%) jako konzervační prostředek. Připraveno k použití. Skladujte při 2-8°C.

Enzymový konjugát (Enzyme Conjugate): Směs kozích polyklonálních protilátek proti toxinům A a B konjugovaných peroxidázou křenu selského, suspendovaná v pufrovaném proteinovém roztoku obsahujícím thimerosal (0,02%). Skladujte při 2-8°C.

Promývací činidlo (Wash Reagent): Pufrovaný roztok obsahující thimerosal (0,01%) jako konzervační prostředek. Skladujte při 2-8°C.

Substrát (Substrate Reagent): Pufrovaný roztok obsahující tetrametyl-benzidin a peroxid. Skladujte při 2-8°C.

MATERIÁL V SOUPRAVĚ

1. ImunoCard Toxiny A a B testovací karty, jednotlivě zabalené do sáčku s vysušovačem.
2. Roztok pro ředění vzorku v plastové lahvičce s kapátkem. Připraveno k použití.
3. Pozitivní kontrola v plastové lahvičce s kapátkem. Připraveno k použití.
4. Promývací činidlo v plastové lahvičce s kapátkem. Připraveno k použití.
5. Substrát v plastové lahvičce s kapátkem. Připraveno k použití.
6. Enzymový konjugát v plastové lahvičce s kapátkem. Připraveno k použití.
7. Plastové pipety s vyznačeným dávkováním 25 a 150 µl.

MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

1. Vzorky lidské stolice.
2. Jednorázové latexové rukavice pro použití při manipulaci s potencionálně infekčními vzorky stolice.
3. Vortex pro vytvoření suspenze vzorků stolice a roztoku pro ředění vzorku.
4. Časovač.
5. Tyčinky pro aplikaci.
6. Malé zkumavky, např. 10 x 75 nebo 12 x 75 mm.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Veškeré reagentie používejte jen pro in vitro diagnostiku.
2. Neskladujte při teplotách vyšších než 2-8°C. Nezamrazujte.
3. Neodchylujte se od popsané metody, jinak se mohou objevit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky.

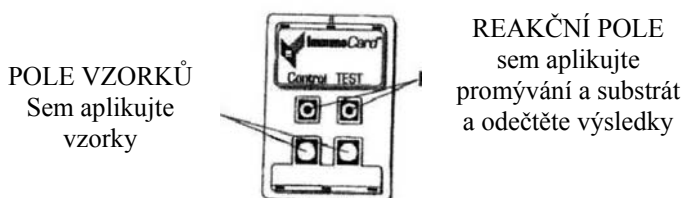
4. Některé vzorky pacientů obsahují infekční látky, proto je potřeba se všemi vzorky pacientů zacházet a zlikvidovat je, jako když jsou biologicky rizikové.
5. Nezaměňujte testovací karty, enzymový konjugát nebo pozitivní kontrolu mezi soupravami různých šarží. Ostatní reagentie (roztok pro ředění vzorku, promývací činidlo, substrát) mohou být měněny mezi soupravami, pokud neuplynula doba jejich expirace. Nepoužívejte žádné reagentie po uplynutí doby expirace.
6. Veškeré vzorky stolice před testováním důkladně promíchejte, bez ohledu na jejich konzistenci. Docílíte tím odebrání reprezentativního vzorku pro testování.
7. Vzorky i reagentie je před provedením testu potřeba vytemperovat na pokojovou teplotu (20-26°C), jinak se může snížit citlivost testu.
8. Karty před vyjmutím ze sáčku zkontrolujte. Karty s porušenou, nebo špatně uzavřenou folií nepoužívejte. Z důvodů poškození nebo špatného uzavření karet v sáčku může dojít ke vzniku falešně negativních výsledků.
9. Pokud jsou roztok na ředění vzorku nebo pozitivní kontrola zbarvené a kalné, nepoužívejte je. Zbarvení nebo zakalení může být známkou bakteriální kontaminace. Promývací činidlo se jeví mírně zakalené normálně.
10. Substrát je citlivý na světlo a měl by se skladovat v temnu. Roztok by měl být čirý, bezbarvý. Nepoužívejte substrát, který je zbarvený nebo zakalený.
11. Při kapání reagentií držte lahvičku vertikálně.

ODEBRÁNÍ A PŘÍPRAVA VZORKU

Vzorky stolice by měly být přepravovány v utěsněné nádobě a skladovány při 2-8°C. Vzorky by měly být testovány co nejdříve po odběru. Mohou být skladovány maximálně 4 dny při 2-8°C. Pokud není možné vzorky během 4 dnů testovat, zmrazte je hned při převzetí a skladujte při -20°C až do testování. Vzorky lze až třikrát opakovaně zmrazit.

POZNÁMKY K METODĚ

- 1 Obrázek dole zobrazuje schéma ImmunoCard testovací karty.

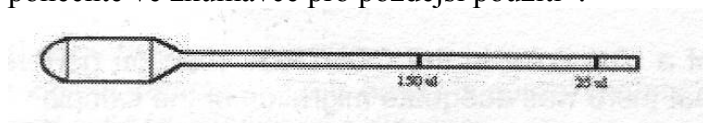


- 2 Sériové provádění jakéhokoliv množství vzorků a pozitivních kontrol je možné, pokud pro každou kartu dodržíte příslušné kroky, posloupnost kroků, přidání reagentií, inkubační časy a časy pro odečtení výsledků. Každý procedurální krok by měl být u všech vzorků ukončen před započtením dalšího kroku.
- 3 Kontrolní (levá) strana každé karty poskytuje interní kontrolu pro každý vzorek. Zaručuje, že individuální vzorky jsou dostatečně naředěné a reagentie jsou v pořádku.

PROVEDENÍ TESTU

1. Před provedením testu vytemperujte veškeré karty, reagentie a vzorky na pokojovou teplotu (20-26°C). Reagentie vyjměte před temperováním z boxu. **Temperování reagentií může trvat až 60 minut. PO POUŽITÍ VŠE NEPRODLĚNE VRAŤTE DO 2-8°C.**
2. Označte si jednu zkumavku pro každý testovaný vzorek pacienta.
3. Přidejte 200µl roztoku pro ředění vzorku do každé zkumavky pomocí kapátka.
4. Přidejte 3 kapky (150µl) enzymového konjugátu do každé zkumavky.
5. Okamžitě přidejte vzorek stolice nebo kontrolní vzorek následovně:

5.A **Tekuté/polotuhé stolice** – Důkladně vzorek stolice promíchejte. Pomocí čisté pipety na přenos (obsažené v soupravě) odeberte stolicí tak, že její objem dosáhne k první značce od špičky (25µl) a nadávkujte ji do směsi roztoku pro ředění s konjugátem. Použijte stejnou pipetu pro rozmíchání vzorku se směsí několikerým nabráním a nadávkováním. Vortexujte směs 10 vteřin. Pipetu ponechte ve zkumavce pro pozdější použití*.



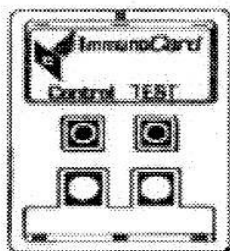
5.B **Formované/tuhé stolice** – Důkladně vzorek stolice promíchejte. Pomocí dřevěné aplikační tyčinky přeneste malé množství (asi 2mm v průměru) stolice do směsi roztoku pro ředění s konjugátem. Pomocí aplikační tyčinky utvořte emulzi vzorku ve směsi a pak důkladně vortexujte 10 vteřin. Přidejte pipetu a nechte ji ve zkumavce pro pozdější použití*.

5.C **Volitelná kontrola:** Pomocí kapátek na lahvičce přidejte jednu kapku pozitivní nebo negativní kontroly (roztok pro ředění vzorku ze soupravy) do směsi roztoku pro ředění vzorku s konjugátem. 10 vteřin vortexujte. Přidejte pipetu a nechte ji ve zkumavce pro pozdější použití.

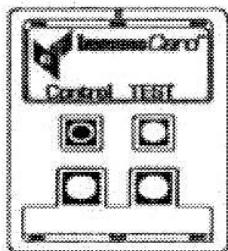
***POZNÁMKA: Nedostatečné množství vzorku nebo nedostatečné rozmíchání a suspendace vzorku ve směsi roztoku pro ředění vzorku s konjugátem může vést k falešně negativním výsledkům. Přílišné množství vzorku stolice může vést k neplatným výsledkům kvůli omezenému pohybu vzorku.**

6. Nechte každý naředěný vzorek stát 5 (±1) minut při 20-26°C.
7. Použijte jednu ImmunoCard testovací kartu pro každý vzorek nebo kontrolu.
8. Vyjměte testovací karty ze sáčku. Obal a vysušovač vyhoďte. Označte karty jménem pacienta nebo kontroly.
9. Před provedením testu vortexujte každý vzorek nebo kontrolu 10 vteřin.
10. Přidejte 150µl naředěného vzorku nebo kontroly do obou políček pro vzorky testovací karty (150µl představuje druhou objemovou značku na pipetě).
11. Inkubujte 5(±1) minutu při 20-26°C. POZNÁMKA: Ke konci inkubace se musí obě reakční políčka jevit úplně vlhká. Pokud tomu tak není, použijte jinou kartu a postup opakujte. Pokračujte v testu, pokud vzorek zůstává v políčkách pro vzorek a přitom jsou obě reakční políčka dokonale vlhká.
12. Nadávkujte přesně 3 kapky promývacího činidla do každého reakčního políčka. Lahvičku s promývacím činidlem držte vertikálně.
13. Když se promývací činidlo úplně absorbuje, nadávkujte přesně 3 kapky substrátu. Lahvičku se substrátem držte vertikálně.
14. Testovací karty inkubujte 5 minut při 20-26°C.
15. **Vizuálně odečtěte výsledky karty do 30 vteřin po ukončení inkubace.**

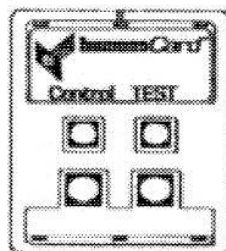
INTERPRETACE VÝSLEDKŮ:



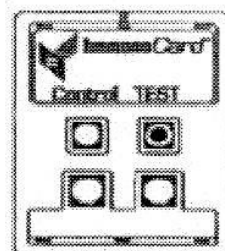
Obr.1
Pozitivní výsledek



Obr.2
Negativní výsledek



Obr.3
Neplatný výsledek



Obr.4
Neplatný výsledek

VÝSLEDKY ODEČÍTEJTE JEN Z HORNÍCH REAKČNÍCH POLÍČEK

POZNÁMKA: Vznik zabarvení v políčkách pro vzorky nemá vliv na výsledek a během testování se nevyhodnocuje.

Pozitivní výsledek testu: (Obr. 1) Modrá barva v reakčních políčkách TEST (nahore vpravo) a KONTROLA (nahore vlevo). Intenzita modré barvy v políčku TEST může být nerovnoměrná. Pozitivní výsledek indikuje, že ve vzorku je přítomen toxin A a/nebo toxin B. Všimněte si, že políčko TEST se může jevit slaběji modré než políčko KONTROLA.

Negativní výsledek testu: (Obr. 2) Modrá barva se objeví jen v políčku KONTROLA (nahore vlevo). Reakční políčko TEST (nahore vpravo) by mělo být bezbarvé (navlhčení membrány způsobuje lehce šedivé zabarvení políčka TEST). Negativní výsledek testu indikuje nepřítomnost toxinů C. difficile nebo jejich přítomnost pod detekční limit testu. Někdy může políčko TEST (nahore vpravo) ukázat náznak modré barvy na levé nebo pravé straně políčka, zatímco zbytek políčka je bezbarvý. Toto považujte rovněž za negativní výsledek.

Neplatné výsledky testu:

1. Nedetekovatelné modré zbarvení v reakčním políčku KONTROLA (Obr. 3 a 4). Nedosažení předpokládaných hodnot u kontroly zneplatňuje jakýkoliv test. Neplatný test může být způsoben špatnými reagensy nebo špatnou testovací kartou, chybou při dávkování vzorku, nedostatečnou migrací vzorku, nebo nedostatečným naředěním vzorku vedoucím k přílišné inkubaci testovací karty. Vzorky s extrémně vysokými hladinami toxinů mohou vykazat pozitivní TEST ale negativní KONTROLU.
2. Modrý prstenec na plastovém rámu obklopující políčko TEST (nahore vpravo) během provádění testu.

Při získání neplatných výsledků opakujte test s novými kartami a znovu naředěným vzorkem.

KONTROLA KVALITY

Každá testovací karta obsahuje vnitřní kontrolu. Objevení se modré barvy v reakčním políčku KONTROLA zaručuje, že test byl v průběhu použití aktivní, že byl dodán vzorek a že migrace vzorku byla adekvátní.

Při dodání ImmunoCard testovacích karet by měla být provedena verifikace reaktivity pomocí externích pozitivních a negativních kontrolních vzorků. Pozitivní kontrola se dodává v soupravě. Kontrola se používá pro verifikaci reaktivity ostatních reagensů testu a není

určena pro zaručení přesnosti při cut-off hodnotu testu. Jako negativní kontrola se používá vzorek pro ředění vzorku. Mohou se provést další testy s kontrolami, aby se vyhovělo místním, státním nebo federálním požadavkům a/nebo akreditačním organizacím. Očekávané výsledky při použití kontrol jsou popsány v sekci Interpretace výsledků. Testovací karty by se neměly používat, pokud kontrolní testy nevykáží správné výsledky. Korektní výsledky získané v políčku KONTROLA s pozitivní a negativní kontrolou (roztok pro ředění vzorku) slouží jako ukazatele správného průběhu testu, aktivity protilátek vázaných na membránu a enzymového konjugátu během testu a správného pohybu vzorku na membráně. Pokud se nedocílí předpokládaných hodnot u interních a externích kontrol, test nebyl proveden správně (např. nedostatečný objem nadávkovaných reagensů, nesprávná inkubační teplota nebo doba, nebo nevytemperování reagensů na pokojovou teplotu před testem). Pro zjištění podstaty nesprávného provedení testu opakujte kontrolní testy.

OMEZENÍ

1. Test je kvalitativní a nelze provést kvantitativní zhodnocení na základě intenzity zbarvení.
2. Pozitivní test potvrzuje přítomnost toxinů A a/nebo B. Lékař musí výsledek testu používat s ohledem na výsledky jiných diagnostických metod a klinický stav pacienta při určování diagnózy onemocnění spojené s *C. difficile*. Hladiny toxinů ne vždy korelují s přítomností nebo stavem onemocnění.
3. Izoláty *C. sordellii* mohou reagovat s tímto testem díky imunologické identitě toxinů *C. sordellii*.
4. Provedení testů pediatrických vzorků nebylo hodnoceno.
5. Byly identifikovány dvě asymptomatické skupiny s vysokou hladinou *C. difficile*. 50% a vyšší kolonizace byla zaznamenána u kojenců a až 32% u pacientů s cystickou fibrózou.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Četnost průjmového onemocnění vyvolaného antibiotiky způsobeném *C. difficile* závisí na několika faktorech, včetně populace pacientů, typu instituce a epidemiologie. Popsaný výskyt onemocnění spojeného s *C. difficile* u pacientů s podezřením na onemocnění vyvolané antibiotiky je 15-20%, různá zařízení mohou mít četnost vyšší nebo nižší. Pozitivní výsledek u neinfikovaného pacienta se nepředpokládá.

SPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY TESTU

Komparativní studie

Tři nezávislé laboratoře testovaly vzorky pomocí ImmunoCard Toxiny A a B a standardním buněčným testem cytotoxicity s neutralizací. Výsledky paralelních testů udává tabulka níže.

Prospektivní vzorky	ICTAB		
	Poz.	Neg.	Celkem
Cytotoxin Poz. (Std)	67	5	72
Cytotoxin Neg. (Std)	2	176	178
Celkem	69	181	250
			95% CI
Klinická citlivost	67/62 (93,1%)		87,1-98,9 %
Klinická specifičnost	176/178 (98,9%)		97,6-100%
Předvídaná hodnota pozitivního testu	67/69 (97,1%)		92,9-100%
Předvídaná hodnota negativního testu	176/181 (97,2)		94,5-99,5%
Retrospektivní vzorky	ICTAB		
	Poz	Neg	Celkem
Cytotoxin Poz (Std)	33	0	33
Cytotoxin Neg (Std)	5	30	308
Celkem	38	303	341
			95% CI
Klinická citlivost	33/33 (100%)		
Klinická specifičnost	303/308 (98,4)		96,4-99,6%
Předvídaná hodnota pozitivního testu	33/38 (86,8%)		76,2-97,8%
Předvídaná hodnota negativního testu	303/303 (100%)		N/A

Analytická citlivost

Dolní limit detekce tímto testem je asi 3ng toxinu A a 3ng toxinu B na 1 ml stolice. Neliší se, ať se jedná o tuhé nebo tekuté/polotuhé stolice.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost ImmunoCard Toxiny A a B byla stanovena pomocí známých negativních (n=2) a pozitivních (n=6), které byly zakódovány a náhodně vybírány, aby se zabránilo jejich identifikaci během testování. Dva z pozitivních vzorků se blížila detekčnímu limitu testu. Tři laboratoře testovaly vzorky tři po sobě následující dny. Vzorky vykázaly očekávané výsledky ve 100%.

Analytická specifičnost

Vzorky stolice naočkované následujícími mikrobiálními agens (do konečné koncentrace vzorku větší než 1×10^8 organismů/ml) nereagují s Immunocard Toxiny A a B: Adenovirus 40, Adenovirus 41, Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, CANDIDA ALBICANS, Clostridium butyricum nontoxigenic C. difficile (10 kmenů), Clostridium perfringens, Clostridium




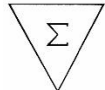








septicum, Clostridium sordellii kmen 9714, Clostridium sporogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli (čtyři kmeny včetně dvou O157:Hz kmenů), Helicobacter pylori, Klebsiella pneumonia, Peptostreptococcus anaerobius, Porphyromonas asaccharolytica, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Rotavirus, Salmonella typhimurium, Serratia liquefaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus Cowan I, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Vibrio parahaemolyticus, Yersina enterocolitica. Jediný mikroorganismus mimo C. difficile reaktivní s ImmunoCard Toxiny A a B byl C. sordellii VPI 9048. Tento kmen produkuje toxiny HT a LT homologní s toxiny A a B.

Interferující látky

Následující látky nemají žádný vliv na výsledky testu pokud jsou přítomny ve stolici v indikovaných koncentracích: tuk ve stolici (4,8%w/v), krev (40%v/v), mucin (3,5% w/v), Metronidazol (0,25%w/v), Vankomycin (0,25% w/v), barium sulfát (5% w/v), Imodium AD® (5% w/v), Kaopectate® Caplets (5mg/ml), Pepto Bismo® (5% v/v).

POUŽITÍ MEZINÁRODNÍCH SYMBOLŮ

S jedním nebo více níže uvedenými symboly se můžete setkat na označení nebo obalech tohoto produktu.

	Použit do		Výrobce
	Šarže		Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů
	Zdravotnický prostředek in vitro		Teplotní omezení
	Tento výrobek splňuje požadavky směrnice 98/79/EC na zdravotnické prostředky in vitro		Pozitivní kontrola
	Katalogové číslo		Negativní kontrola
	Řiďte se návodem k použití		Autorizovaný zástupce pro EC



Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: (513) 271-3700



Meridian Bioscience Europe
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese (MI)
Italy
Tel.: +39 0331 433636
Fax: +39 0331 433616
E-mail: info@mdeur.com

**Distributor
pro ČR**

Dynex Laboratories s.r.o.
Na Čihadle 32
160 00 Praha 6
Tel.: +420 220 303 600
Fax: +420 224 320 133
E-mail: office@dynex.cz
www.dynex.cz



SN11223

Rev. 10/04