

TECHLAB®

C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE®

Szybki membranowy test immunoenzymatyczny
do jednoczesnego wykrywania
antygeny dehydrogenazy glutaminianowej oraz toksyn A i B *Clostridium difficile*
w próbkach kału

Nr kat. T30525C (25 testów) lub T30550C (50 testów)

Patent U.S. Nr: 5,965,375

Patent dodatkowy w trakcie procedury

Opracowany i wyprodukowany przez:



Blacksburg, VA 24060



Dystrybutor



Alere North America, Inc.
30 South Keller Road
Orlando, Florida 32810
Tel: 1-877-441-7440
1-321-441-7200 (poza USA)

Logo Alere i Aler są znakami handlowymi grupy firm Alere.

C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE® i TECHLAB są znakami handlowymi TECHLAB®, Inc.

Made in USA.

© 2010 TECHLAB®, Inc. Wszystkie prawa zastrzeżone

Nr instrukcji: 91-T525C- 01

Wydanie: 05/2015

Międzynarodowe symbole - klucz



Numer katalogowy



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer serii



Zawiera ilość odczynników
wystarczającą na <n> testów



Zakres temperatur



Użyć przed upływem daty ważności



Oznakowanie CE

Uwaga, zapoznać się z
załączonymi dokumentami

TECHLAB® C. DIFFICILE QUIK CHEK COMPLETE®

PRZEZNACZENIE

Test C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE COMPLETE® firmy TECHLAB® jest szybkim membranowym testem immunoenzymatycznym stosowanym do jednoczesnego wykrywania antygenu dehydrogenazy glutaminianowej *Clostridium difficile* oraz toksyn A i B w jednej studzience reakcyjnej. w próbkach kału pobranych od osób podejrzanych o zachorowanie na *C. difficile*. Jako badanie przesiewowe na obecność *C. difficile* test wykrywa antygen *C. difficile*, dehydrogenazę glutaminianową, i potwierdza obecność toksynotwórczego *C. difficile* poprzez wykrycie toksyn A i B w próbkach kału pochodzącego od osób podejrzanych o chorobę wywołaną przez *C. difficile*. Test powinien być stosowany jako pomoc w diagnozie zachorowań na *C. difficile*. Jak w przypadku innych testów na *C. difficile*, wyniki powinny być rozpatrywane w połączeniu z historią pacjenta.

TYLKO DO UŻYTKU DIAGNOSTYCZNEGO IN VITRO.

WYJAŚNIENIE

Po leczeniu antybiotykowym u wielu pacjentów występują problemy żołądkowo-jelitowe, począwszy od łagodnych biegunek po ciężkie rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego. Wiele przypadków łagodniejszych postaci chorób żołądkowo-jelitowych i większość przypadków rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego spowodowanych jest przez toksynotwórcze szczepy *Clostridium difficile* (1). Organizm ten jest oportunistyczną bakterią beztlenową, która rozwija się w jelicie po tym jak normalna flora została zmieniona przez antybiotyki. Toksynotwórcze szczepy *C. difficile* posiadają geny kodujące toksyny, podczas gdy szczepy nietoksynotwórcze nie posiadają genów toksyn. Choroba powodowana jest przez toksyny wytwarzane przez organizm toksynotwórczy. Uważa się, że za objawy kliniczne związane z chorobą odpowiada przede wszystkim toksyna A, która jest enterotoksyną niszczącą tkankę (2,3). *Clostridium difficile* wytwarza również drugą toksynę, oznaczoną jako toksyna B. Toksyna B, która nazywana jest cytotoksyną organizmu, jest toksyną wykrywaną przez hodowlę tkankową, stosowaną obecnie przez niektóre laboratoria. Toksynotwórcze szczepy *C. difficile* wytwarzają albo obie toksyny albo jedynie toksynę B (4-7). Dehydrogenaza glutaminianowa *C. difficile* jest dobrym markerem antygenu bakterii w kale ponieważ jest wytwarzana w dużych ilościach przez wszystkie szczepy, toksynotwórcze i nietoksynotwórcze (8-10). Antygen jest wykrywalny w próbkach kału przy zastosowaniu testu C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE®. Wynik dodatni w teście, który jest swoisty dla dehydrogenazy glutaminianowej *C. difficile* potwierdza obecność tego organizmu w próbce kału; wynik ujemny wskazuje na nieobecność organizmu. Wynik dodatni testu dla toksyn A i B potwierdza obecność toksynotwórczego *C. difficile*.

ZASADA TESTU

Test C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® wykorzystuje przeciwciała swoiste dla dehydrogenazy glutaminianowej oraz toksyn A i B *C. difficile*. Na płytce znajduje się okienko reakcyjne z trzema pionowymi liniami unieruchomionych przeciwciał. Linia testowa antygenu ("Ag") pokryta jest przeciwciałami przeciwko dehydrogenazie glutaminianowej *C. difficile*. Linia kontrolna ("C") jest linią przerywaną zawierającą przeciwciała przeciwko peroksydazie chrzanowej (HRP). Linia testowa toksyn A i B ("Tox") pokryta jest przeciwciałami przeciwko toksynom A i B *Clostridium difficile*. Koniugat składa się z przeciwciał przeciwko dehydrogenazie glutaminianowej oraz przeciwciał przeciwko toksynom A i B, sprzężonym z peroksydazą chrzanową. Aby wykonać test należy dodać próbkę do próbki zawierającej mieszaninę Rozcieńczalnika i Koniugatu. Następnie mieszanina koniugatu z rozcieńczoną próbką dodawana jest do Studzienki na próbkę i płytka pozostawiona zostaje na 15 minut w temperaturze pokojowej celem inkubacji. Podczas inkubacji dehydrogenaza glutaminianowa oraz toksyny A i B obecne w próbce wiążą się z koniugatem przeciwciała-peroksydaza. Kompleksy antygen-przeciwciała-koniugat migrują przez wkładkę filtrującą do membrany, gdzie są wychwytywane przez unieruchomione na liniach przeciwciała swoiste dla dehydrogenazy glutaminianowej oraz przeciwciała swoiste dla toksyn A i B. Następnie Okienko reakcyjne przepłukiwane jest Buforem płuczającym, po czym dodany zostaje Substrat. Po 10-cio minutowej inkubacji odcenia się wizualnie reakcję "Ag" na obecność pionowej niebieskiej linii po stronie "Ag" Okienka reakcyjnego. Niebieska linia oznacza wynik dodatni. Jeśli "Ag" jest dodatnie, wtedy należy ocenić reakcję "Tox" wizualnie na obecność niebieskiej linii po stronie "Tox" Okienka reakcyjnego. Linia niebieska wskazuje na wynik dodatni. Dodatnia reakcja "C" w postaci pionowej, przerywanej niebieskiej linii po stronie "C" Okienka reakcyjnego potwierdza, że test działa prawidłowo i że jego wynik jest ważny.

MATERIAŁY DOSTARCZONE

MEM	DEV
-----	-----

Płytki testowe – każda torebka zawiera 1 płytkę

DIL	SPE
-----	-----

Rozcieńczalnik (22 ml w butelce) - buforowany roztwór białka ze skalowanym zakraplaczem (zawiera 0,05% ProClin® 300)



WASH	REAG
------	------

Bufor płuczący (12 ml w butelce) - buforowany roztwór ze skalowanym zakraplaczem (zawiera 0,05% ProClin® 300)



SUBS	REAG
------	------

Substrat (3.5 ml w butelce) - roztwór zawierający tetrametylobenzydynę

CONJ	ENZ
------	-----

Koniugat (2.5 ml w butelce) - mysie przeciwciała monoklonalne swoiste dla dehydrogenazy glutaminianowej sprzężone z peroksydazą chrzanową i kozie przeciwciała poliklonalne swoiste dla toksyn A i B sprzężone z peroksydazą chrzanową w buforowanym roztworze białka. (zawiera 0,05% ProClin® 300)



CONTROL	+
---------	---

Kontrola dodatnia (2 ml) - antygen w buforowanym roztworze białka

Jednorazowe plastikowe pipetki - ze znacznikami na 25 µl, 400 µl i 500 µl)

IVD Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro

Uwaga

H317: Może powodować reakcje alergiczne na skórze
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, LECZ NIEDOSTARCZONE

Małe próbki (Np. plastikowe próbki Eppendorf lub próbki szklane)

Aplikatory

Zegar

Jednorazowe rękawiczki do pracy z próbkami kału

Mieszadło typu vortex

Pipetor i końcówki

TRWAŁOŚĆ I PRZECHOWYWANIE

Data ważności zestawu podana jest na etykiecie. Daty ważności każdego składnika podane są na poszczególnych etykietach. Zestaw powinien być przechowywany w temperaturze pomiędzy 2° a 8°C.

OSTRZEŻENIA

1. Nie powinno się mieszać odczynników z różnych zestawów. Nie używać zestawu po podanej dacie ważności.
2. Każdy składnik zestawu powinien być obejrany pod kątem jakichkolwiek nieszczelności. Przy dostawie, należy sprawdzić czy składniki nie są zamrożone lub ciepło przy dotyku z powodu niewłaściwych warunków wysyłki.
3. Należy doprowadzić wszystkie składniki do TEMPERATURY POKOJOWEJ PRZED ICH UŻYCIEM.
4. Zakrętki, końcówki i buteleczki z zakraplaczem posiadają kolorowe oznaczenie kodowe; NIE mieszać lub zamieniać ich!
5. Nie zamrażać odczynników. Zestaw powinien być przechowywany w temperaturze pomiędzy 2° a 8°C.
6. Opakowanie zawierające Płytkę testową powinno być doprowadzone do temperatury pokojowej przed otwarciem i otwarte bezpośrednio przed użyciem. Przechowywać płytki w suchym miejscu.
7. W celu uzyskania optymalnych wyników użyć próbki kału w ciągu 72 godzin od pobrania. Próbkę, które zostały zamrożone mogą stracić swoją aktywność z powodu zamrażania i odmrażania. Jeśli stosowane są próbki zamrożone, należy rozmrażać je w temperaturze pokojowej.
8. Dodając odczynniki trzymać buteleczki z zakraplaczem w pozycji pionowej celem zapewnienia właściwej wielkości kropli.
9. Próbkę i płytkę testową należy traktować i utylizować po użyciu jako zagrożenie biologiczne.
10. Płytek testowych nie można powtórnie używać.
11. Test został zoptymalizowany pod kątem czułości i swoistości. Zmiana podanej procedury i/lub warunków wykonania testu może mieć wpływ na czułość i swoistość testu. Należy postępować ściśle według podanej procedury.
12. W przypadku badania więcej niż jednej próbki kału zwracać uwagę na całkowity czas oznaczenia. Najpierw dodać Rozcieńczalnik, a potem do każdej próbki z Rozcieńczalnikiem dodać Koniugat. Następnie dodać próbki do probówek z Rozcieńczalnikiem/Koniugatem. Dokładnie wymieszać wszystkie rozcieńczone próbki i wtedy przenieść je na Płytkę testową. 15-to minutowy okres inkubacji zaczyna się od momentu przeniesienia ostatniej rozcieńczonej próbki z koniugatem na ostatnią Płytkę testową.
13. Jeśli Substrat zmieni kolor na ciemnoniebieski/ fioletowy należy skontaktować się z dostawcą w celu wymiany.
14. Próbkę kału mogą zawierać substancje potencjalnie zakaźne i powinny być traktowane na "Poziomie bezpieczeństwa biologicznego 2" zgodnie z zaleceniami w instrukcji CDC / NIH "bezpieczeństwa biologicznego w laboratoriach mikrobiologicznych i biomedycznych".
15. Wszystkie wyroby w zestawie to odczynniki medyczne do diagnostyki in vitro.
16. Nosić rękawiczki jednorazowe w trakcie wykonywania testu.
17. Odczynnik do rozcieńczania zawiera 0,05% ProClin® 300 jako środka konserwującego. Chociaż stężenie jest niskie, ProClin® 300 uznawany jest za środek szkodliwy. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki, zasięgnąć porady lekarza / Uwaga. Zdjąć zanieczyszczoną odzież i umyć ją przed ponownym użyciem. Używać odczynników według obowiązujących przepisów dotyczące bezpieczeństwa laboratoryjnego i dobrej praktyki laboratoryjnej. Karty Charakterystyki tego produktu są dostępne na żądanie, skontaktuj się z dystrybutorem.
18. W celu utylizacji odpadów należy stosować się do krajowych, regionalnych i lokalnych zaleceń.

POBIERANIE PRÓBEK KAŁU I OBCHODZENIE SIĘ Z NIMI

Dopuszczalny typy próbek
Świeże próbki kału
Mrożone próbki kału
Próbki na podłożach transportowych (Cary Blair, C&S)

Nie używać
Do próbek w utrwalcach na bazie formaliny (np. formalinie octowo sodowej, 10% formalinie, mertiolat formalinie)
Do próbek w utrwalcach na bazie alkoholu (np. alkohol poliwinylowy)

Temperatura przechowywania próbki	Dopuszczalna długość przechowywania	Uwagi
2°C – 8°C	72 godziny	Idealna próbka nie powinna mieć więcej niż 24 godziny
Zamrożone w ≤ - 10°C	Dłużej niż 72 godziny	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie może spowodować utratę aktywności próbki w związku z degradacją toksyny

1. Właściwe są standardowe procedury laboratoryjne pobierania i obchodzenia się z próbkami kału.
2. Próbkę kału powinny być pobierane do czystego, szczelnego pojemnika.
3. NIE zaleca się przechowywania próbek w Rozcieńczalniku.
4. Nie dopuścić, aby próbki kału pozostały w Rozcieńczalniku/Koniugacie przez czas dłuższy niż 24 godziny.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

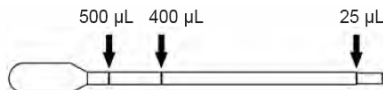
1. Przed użyciem doprowadzić wszystkie odczynniki i wymaganą ilość płytek do temperatury pokojowej. Zaleca się usunąć odczynnik z wkładki piankowej w celu zmniejszenia czasu potrzebnego do osiągnięcia temperatury pokojowej.
2. Przygotować i oznaczyć po jednej małej probówce dla każdej próbki i opcjonalnie dla zewnętrznych kontroli, jeżeli jest to konieczne.
3. Używając czarnej buteleczki ze skalowanym zakraplaczem dodać 750 µl (drugi znacznik od końcówki) Rozcieńczalnika do każdej próbki na próbkę kału. W przypadku próbek pobranych na podłoża transportowe takie jak Cary Blair lub C&S do każdej próbki dodać 650 µl Rozcieńczalnika.

Typ próbki	Objętość diluentu
Świeże próbki kału	750 ul (druga podziałka od końcówki)
Mrożone próbki kału (zamrożone, nierozcieńczone)	750 ul (druga podziałka od końcówki)
Próbki na podłożach transportowych (Cary Blair, C&S)	650 ul (podziałka niedostarczona)
Zewnętrzne kontrole (pozytywne i negatywne)	750 ul (druga podziałka od końcówki)



4. Dodać jedną kroplę Koniugatu (buteleczka z czerwoną zakrętką) do każdej próbki.
5. Wyjąć 1 jednorazową plastikową pipetkę (dostarczoną w zestawie) na każdą próbkę - pipetki posiadają znaczniki na 25 µl, 400 µl i 500 µl.

Skalowana pipetka:



6. Dokładnie wymieszać wszystkie próbki bez względu na ich konsystencję - ważne jest, aby próbki miały jednorodną zawiesistość przed ich przeniesieniem.

Próbki ciekłe/półstałe - nabrać 25 µl próbki pipetką i napipetować do roztworu Rozcieńczalnika/Koniugatu. Użyć tej samej pipetki do wymieszania rozcieńczonej próbki.

Próbki stałe/twarde próbki - należy zwrócić uwagę, aby dodać właściwą ilość stałego kału do roztworu. Dokładnie wymieszać próbkę używając drewnianej bagietki aplikacyjnej i przenieść małą objętość próbki (o średnicy około 2 mm, odpowiednik 25 µl) do roztworu Rozcieńczalnika/Koniugatu. Wymieszać próbkę przy użyciu bagietki aplikacyjnej.

Próbki kału na podłożu transportowym Cary Blair lub C&S - napipetować 100 µl próbki (2 krople z pipetki) do roztworu Rozcieńczalnika/Koniugatu.

7. Opcjonalne próbki kontroli zewnętrznej:

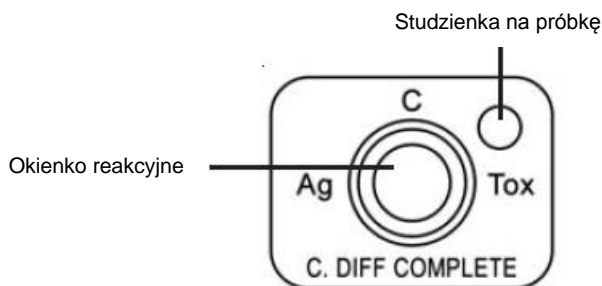
Zewnętrzna kontrola dodatnia – dodać jedną kroplę Kontroli dodatniej (buteleczka z szarą zakrętką) do roztworu Rozcieńczalnika/Koniugatu.

Zewnętrzna kontrola ujemna - dodać 25 µl Rozcieńczalnika do roztworu Rozcieńczalnika/Koniugatu.

UWAGA: Przeniesienie zbyt małej ilości próbki lub niewymieszanie i niecałkowite rozprowadzenie próbki w roztworze Rozcieńczalnika może skutkować wynikami fałszywie ujemnymi. Dodanie zbyt dużej ilości próbki kału może skutkować wynikami nieważnymi z powodu ograniczenia przepływu próbki.

WYKONANIE OZNACZENIA

1. Wyjąć jedną Płytkę testową na każdą próbkę i po jednej płytce na opcjonalną zewnętrzną kontrolę dodatnią lub ujemną, w zależności od potrzeby. Foliowe opakowania powinny zostać doprowadzone do temperatury pokojowej przed ich otwarciem. Test należy użyć natychmiast po otwarciu opakowania. Oznakować każdą płytkę i położyć na płaskiej powierzchni w taki sposób, aby nadruk "C. DIFF COMPLETE" znajdował się na dole płytki, a mała Studzienka na próbkę (Sample Well) w prawym górnym rogu płytki.



2. Zamknąć każdą próbkę z rozcieńczoną próbką i dokładnie wymieszać. Prawidłowe wymieszanie można uzyskać używając mieszadła lub poprzez obracanie próbki w górę i dół. Po rozcieńczeniu w mieszanke Rozcieńczalnik/ koniugat, próbka pacjenta lub kontrola dodatnia, przed zakropieniem na płytce testowej może być inkubowana w temperaturze pokojowej do 24 godziny.

3. Używając nowej pipetki, przenieść 500 µl rozcieńczonej mieszanki próbki z koniugatem do Studzienki na próbkę na płytce testowej (mały otwór w górnym, prawym rogu płytki), upewniając się, że ciekła próbka została napipetowana na absorbującą membranę wewnątrz Płytki testowej. W trakcie dodawania próbki do Studzienki na próbkę należy upewnić się, że końcówka pipetki jest nachylona w kierunku Okienka reakcyjnego (większy otwór w środku płytki).

4. Inkubować płytkę przez 15 minut w temperaturze pokojowej - próbka przesączy się wewnątrz płytki i wilgotny obszar widoczny będzie w Okienku reakcyjnym.

UWAGA NA PRÓBKĘ, KTÓRE NIE MIGRUJĄ

Czasami nie można zbadać rozcieńczonej próbki kału z powodu zatkania membrany i wtedy próbka nie przeniknie poprawnie do okienka reakcyjnego. Jeżeli rozcieńczona próbka kału nie przeniknie poprawnie w ciągu 5 minut od dodania próbki do Studzienki na próbkę (tzn. membrana w Okienku reakcyjnym nie jest całkowicie wilgotna), wtedy dodać 100 µl (4 krople) Rozcieńczalnika do Studzienki na próbkę i odczekać kolejne 5 minut (łącznie 20minut).

5. Po inkubacji dodać 300 µl Buforu płuczącego do **Okienka reakcyjnego** przy użyciu skalowanej buteleczki z białym zakraplaczem. Odczekać aż Bufor płuczący wpłynie do Okienka reakcyjnego i zostanie całkowicie zaabsorbowany.

6. Dodać 2 krople Substratu (buteleczka z białą zakrętką) do **Okienka reakcyjnego**. Po 10 minutach odczytać i zanotować wyniki.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

1. Interpretacja testu jest najbardziej wiarygodna kiedy wyniki odczytane są bezpośrednio pod koniec 10 minutowego czasu reakcji. Odczytać wynik z normalnej odległości, w dobrze oświetlonym miejscu. Oglądać płytkę z linią wzroku bezpośrednio nad płytką.

2. Należy przyjrzeć się czy pojawiły się niebieskie kropki w środku Okienka reakcyjnego; jest to wewnętrzna kontrola dodatnia. Pojawienie się każdej ilości kropek/ kropki oznacza, że działa kontrola wewnętrzna. Tło może zmieniać kolor od jasnego do ciemno niebieskiego. Zaobserwować czy pojawiła się niebieska linia po stronach „Ag” i „Tox” Okienka reakcyjnego; są to linie testowe. Intensywność linii może być zmienna, od białej do ciemnej.

3. **Wynik dodatni dla antygenu („Ag”)**: Wynik dodatni dla antygenu można zinterpretować w jakimkolwiek momencie pomiędzy dodaniem Substratu a 10-cio minutowym czasem odczytu. Pojawienie się niebieskiej linii „Ag” łącznie z niebieską, przerywaną linią kontrolną pod „C” (Rys. 1) należy interpretować jako wynik dodatni dla antygenu. Intensywność linii może być zmienna, od białej do ciemnej. Wyraźna linia częściowa interpretowana jest jako wynik dodatni. Nie interpretować odbarwienia membrany jako wynik dodatni. Wynik dodatni wskazuje na obecność *C. difficile*.

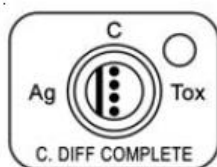
4. **Wynik dodatni dla toksyny („Tox”)**: Jeśli wynik dla antygenu jest dodatni (tzn. jeśli widoczna jest niebieska linia „Ag” i przerywana, niebieska linia kontrolna pod „C”) należy przejść do interpretacji wyniku dla toksyn. Wynik dodatni dla toksyn można zinterpretować w jakimkolwiek momencie pomiędzy dodaniem Substratu a 10-cio minutowym czasem odczytu. Pojawienie się niebieskiej linii „Tox” (Rys. 1b) oznacza wynik dodatni dla toksyn. Intensywność linii może być zmienna, od białej do ciemnej. Wyraźna linia częściowa interpretowana jest jako wynik dodatni. Nie interpretować odbarwienia membrany jako wynik dodatni. Wynik dodatni wskazuje na obecność toksyn *C. difficile*.

5. **Wynik ujemny**: Nie wolno interpretować testu jako ujemny lub nieważny przed upłynięciem 10 minut od dodania Substratu. Widoczna jest jedna przerywana, niebieska linia w środku Okienka reakcyjnego, pod „C” i nie ma widocznych linii testowych po stronie „Ag” lub „Tox” Okienka reakcyjnego (Rys. 1c). Wynik ujemny w części antygenu oznacza, że antygen *C. difficile* jest albo nieobecny w próbce albo jest poniżej granicy wykrywalności testu. Wynik ujemny w części toksyn oznacza, że toksyny *C. difficile* są albo nieobecne w próbce albo są poniżej granicy wykrywalności testu.

6. **Wynik nieważny**: Brak widocznych linii w Okienku reakcyjnym (Rys. 1d). Wynik testu jest nieważny, jeżeli po zakończeniu okresu reakcji, pod „C”, nie pojawiła się przerywana, niebieska linia kontrolna (Rys. 1e, 1f, 1g).

7. **Wynik ujemny dla antygenu („Ag”), dodatni dla toksyn („Tox”)**: procent próbek może dać wyniki ujemne dla antygenu, ale dodatnie dla toksyn. Takie próbki uważa się za nieoznaczone i należy je ponownie przebadać używając świeżej próbki (Rys. 1h). Jeśli próbka badana powtórnie będzie dodatnia dla toksyn i ujemna dla antygenu, wynik należy zapisać jako dodatni dla toksyn.

Rys. 1: INTERPRETACJA WYNIKÓW C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®



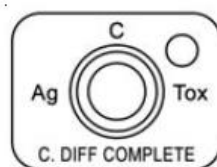
Rys. 1a
Wynik dodatni dla
antygeny



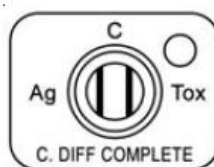
Rys. 1b
Wynik dodatni dla
antygeny i toksyn



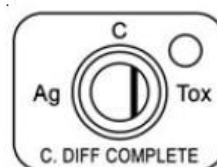
Rys. 1c
Wynik ujemny



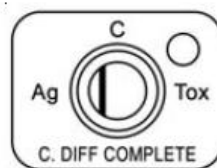
Rys. 1d
Wynik nieważny



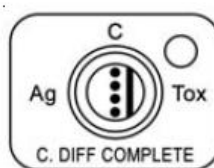
Rys. 1e
Wynik nieważny



Rys. 1f
Wynik nieważny



Rys. 1g
Wynik nieważny



Rys. 1h
Interpretacja w pkt. 7

KONTROLA JAKOŚCI

Wewnętrzna: Niebieska, przerywana linia kontrolna musi być widoczna w środku Okienka reakcyjnego, pod „C” na każdej płytce testowej używanej do wykonania badania. Pojawienie się niebieskich kropek kontrolnych potwierdza, że próbka i odczynniki zostały prawidłowo dodane i że odczynniki były aktywne w chwili wykonywania oznaczenia, a próbka prawidłowo przeniknęła przez Płytke testową. Czyste tło w obszarze wyników traktowane jest jako wewnętrzna kontrola ujemna. Jeżeli test został prawidłowo wykonany i odczynniki zachowały się poprawnie, tło będzie czyste, a wynik widoczny.

Zewnętrzna: Reaktywność zestawu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® powinna zostać sprawdzona w momencie jego otrzymania, za pomocą kontroli dodatniej i kontroli ujemnej (Rozcieńczalnik). Kontrola dodatnia dostarczona jest w zestawie (buteleczka z szarą zakrętką). Kontrola dodatnia potwierdza reaktywność pozostałych odczynników stosowanych w oznaczeniu, ale nie jest przeznaczona do zapewnienia precyzji analitycznej oznaczenia przy progu odcięcia testu. Rozcieńczalnik używany jest jako kontrola ujemna. Można wykonać dodatkowe testy z kontrolami, w celu zapewnienia zgodności z wymaganiami lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi czy wymaganiami jednostek akredytujących.

OGRANICZENIA

1. Test C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® stosowany jest do wykrywania antygeny i toksyny / toksyn *C. difficile* w próbkach kału. Test potwierdza obecność toksyny w kale i informacja ta powinna być wzięta pod uwagę przez lekarza w świetle historii klinicznej oraz fizycznego badania pacjenta. Test C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® wykrywa toksynę A na poziomie ≥ 0.63 ng/ml, toksynę B na poziomie ≥ 0.16 ng/ml oraz dehydrogenazę glutaminianową na poziomie ≥ 0.8 ng/ml.
2. Próbkę kału są wyjątkowo złożonymi próbkami klinicznymi. Optymalne wyniki w teście C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® uzyskuje się w próbkach, które mają mniej niż 24 godziny od pobrania. Większość nierozcieńczonych próbek można przechowywać w temp. pomiędzy 2° a 8°C przez 72 godziny zanim zostanie zaobserwowana znaczna degradacja toksyn. Jeżeli próbki nie zostaną zbadane w tym czasie, mogą być zamrożone i odmrożone. Jednak powtórne zamrażanie i odmrażanie może skutkować utratą immunoreaktywności antygeny i toksyn A i B.
3. Niektóre próbki mogą dawać słabe reakcje. Może to być spowodowane paroma czynnikami takimi jak: obecność niskich poziomów antygeny i/lub toksyn, obecność substancji wiążących, lub enzymów dezaktywujących w kale. W takiej sytuacji należy zbadać świeżą próbkę. Dodatkowe badania, które mogą być zastosowane w połączeniu z testem C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® obejmują hodowlę z badaniem toksynotwórczym lub hodowlę tkanek celem wykazania cytotoksyczności do wykrywania *C. difficile* i jej toksyny/toksyn.
4. Próbkę kału, które zostały zakonserwowane w 10% formalinie, MF, SAF lub PVA nie mogą być używane.
5. C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® jest testem jakościowym. Intensywność zabarwienia nie powinna być interpretowana ilościowo.
6. Niektóre izolaty *C. sordelli* mogą reagować z testem C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®, ponieważ wytwarzają toksyny pokrewne immunologicznie (1).
7. Stopień kolonizacji u dzieci oszacowano na do 50%. Wysoki stopień wykazany został również u pacjentów z mukowiscydozą (1,3).
8. Jedynym organizmem innym niż *C. difficile*, który reagował w obszarze toksyn testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® było *Clostridium sordelli* VPI 9048. Ten szczep wytwarza toksyny HT i LT, które są homologiczne do, odpowiednio, toksyny A i B.

OCZEKIWANE WARTOŚCI

Choroba związana z *Clostridium difficile* jest przede wszystkim chorobą szpitalną pacjentów starszych, a częstotliwość choroby jest zależna od czynników takich jak populacja, rodzaj jednostki szpitalnej oraz epidemiologii. Odnotowane występowanie chorób związanych z *C. difficile* u pacjentów z biegunkami poantybiotykowymi wynosi pomiędzy 5 a 20%; szpitale mogą notować częstość

występowania mniejszą lub większą niż ten zakres. Ważne jest, aby rozpatrywać wszystkie wyniki badań w połączeniu z objawami klinicznymi, ponieważ niektórzy zdrowi dorośli i duża liczba zdrowych dzieci (do 50%) będzie miała wynik dodatni na toksynę *C. difficile*. Ponadto, u pacjentów z mukowiscydozą odnotowano nosicielstwo w zakresie 22 do 32% (1,3). W badaniach przeprowadzonych z tym testem na pacjentach symptomatycznych, występowanie toksyn A i B wyniosło 12%, a GDH 18%. Wynik dodatni w części antygenowej testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® potwierdza obecność *C. difficile* w próbce kału; wynik ujemny wskazuje na nieobecność organizmu. Wynik dodatni w części toksyn testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® potwierdza obecność toksyn *C. difficile* w próbce kału; wynik ujemny wskazuje na nieobecność toksyn lub poziomy toksyn niewystarczające do wykrycia.

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Ocena kliniczna części antygenowej testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®

Część antygenowa testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® została porównana z badaniem hodowli bakteryjnej. Próbkę włączone do oceny zostały przesłane do laboratoriów klinicznych celem rutynowego zbadania. Badanie hodowli bakteryjnej zostało wykonane zgodnie z wewnętrzną procedurą. Poniższa Tabela 1 pokazuje wyniki.

Tabela 1. Podsumowanie działania w porównaniu testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® z hodowlą bakteryjną.

n = 1 126	Dodatnia hodowla bakteryjna	Ujemna hodowla bakteryjna
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Dodatnia linia antygeny	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Ujemna linia antygeny	21	842

	Granice przedziału ufności 95%	
Czułość	90.5%	85.7 – 93.9
Swoistość	93.1%	91.2 – 94.7
Dodatnia wartość predyktywna	76.4%	70.7 – 81.3
Ujemna wartość predyktywna	97.6%	96.2 – 98.4
Korelacja	92.6%	91.8 – 93.4%

Próbki niezgodne zostały rozstrzygnięte przy zastosowaniu rynkowych testów ELISA do wykrywania dehydrogenazy glutaminianowej *C. difficile*. Dwadzieścia dziewięć z 62 fałszywie dodatnich próbek dało wynik dodatni w innym teście na GDH i zostały sklasyfikowane jako prawdziwie dodatnie. Z 21 próbek fałszywie ujemnych trzynaście dało wynik ujemny w innym teście na GDH i zostały sklasyfikowane jako prawdziwie ujemne.

Część antygenowa testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® została porównana z badaniem hodowli tkankowej w celu wykrycia toksyn *C. difficile*. Próbkę włączone do oceny zostały przesłane do laboratoriów klinicznych celem rutynowego zbadania. Wyniki pokazuje Tabela 2. Część antygenowa testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® wykryła 98.7% próbek, które były oznaczone jako dodatnie w hodowli tkankowej.

Tabela 2. Podsumowanie działania w porównaniu testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® z badaniem hodowli tkankowej.

n = 1 126	Dodatnia hodowla tkankowa	Ujemna hodowla tkankowa
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Dodatnia linia antygeny	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Ujemna linia antygeny	2	861

Ocena kliniczna części toksyn testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®

Część toksyn testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® została porównana z badaniem hodowli tkankowej w dwóch laboratoriach klinicznych oraz wewnętrznie, w TECHLAB®, Inc.. Próbkę włączone do oceny zostały przesłane do laboratoriów klinicznych celem rutynowego zbadania. Tabela 3 pokazuje wyniki.

Tabela 3. Podsumowanie działania w porównaniu testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® z badaniem hodowli tkankowej.

n = 1 126	Dodatnia hodowla tkankowa	Ujemna hodowla tkankowa
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Dodatnia linia toksyn	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Ujemna linia toksyn	19	964

	Granice przedziału ufności 95%	
Czułość	87.8%	81.4 – 92.3
Swoistość	99.4%	98.6 – 99.7
Dodatnia wartość predyktywna	95.8%	90.7 – 98.3
Ujemna wartość predyktywna	98.1%	96.9 – 98.8
Korelacja	97.8%	97.6 – 98.0

Próbki niezgodne zostały rozstrzygnięte przy zastosowaniu rynkowych testów ELISA do wykrywania toksyn A i B. Pięć z 6 fałszywie dodatnich próbek dało wynik dodatni w teście ELISA i zostały sklasyfikowane jako prawdziwie dodatnie. Dwanaście z 19 próbek fałszywie ujemnych dało wynik ujemny w teście ELISA i zostały sklasyfikowane jako prawdziwie ujemne.

WPLYW KONSYSTENCJI PRÓBK KI KAŁU

Wpływ konsystencji próbek kału na badanie C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®

Tabele 4 i 5 pokazuje reakcje próbek kału o różnej konsystencji w części antygenowej (n=978) oraz części toksyn (n=981) testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®. Procent reakcji dodatnich przy zastosowaniu badania hodowli albo testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® były podobne dla wszystkich trzech typów próbek (płynne, półpłynne i stałe). Wszystkie próbki poddano badaniu na C. difficile. Podstawą skierowania na badania była historia kliniczna pacjenta, a nie konsystencja próbki. W części antygenowej wyniki pokazują, że przy badaniu próbek różnej konsystencji działanie testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® jest podobne do badania hodowli bakteryjnej. W części toksyn wyniki pokazują, że przy badaniu próbek różnej konsystencji działanie testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® jest podobne do badania hodowli tkankowej.

Tabela 4. Reakcje próbek kału o różnej konsystencji w części antygenowej testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®

Liczba próbek (n=978)	Próbki płynne (n=335)	Próbki półpłynne (n=522)	Próbki stałe (n=121)
Dodatnie w badaniu hodowli bakteryjnej	59 (17.6%)	110 (21.1%)	19 (15.7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Dodatnia linia antygeny	72 (21.5%)	128 (24.5%)	25 (20.7%)
Ujemne w badaniu hodowli bakteryjnej	276 (82.4%)	412 (78.9%)	102 (84.3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Ujemna linia antygeny	263 (78.5%)	394 (75.5%)	96 (79.3%)

Tabela 5. Reakcje próbek kału o różnej konsystencji w części toksyn testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®

Liczba próbek (n=981)	Próbki płynne (n=336)	Próbki półpłynne (n=523)	Próbki stałe (n=122)
Dodatnie w badaniu hodowli tkankowej	43 (12.8%)	81 (15.5%)	8 (6.6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Dodatnia linia toksyn	42 (12.5%)	72 (13.8%)	7 (5.7%)
Ujemne w badaniu hodowli tkankowej	293 (87.2%)	442 (84.5%)	114 (93.4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Ujemna linia toksyn	294 (87.5%)	451 (86.2%)	115 (94.3%)

CZUŁOŚĆ ANALITYCZNA

Próg odcięcia dla badania wyznaczony został przy stężeniu 0.63 ng/ml dla toksyny A, 0.16 ng/ml dla toksyny B i 0.8 ng/ml dla dehydrogenazy glutaminianowej.

ODTWARZALNOŚĆ

Odtwarzalność testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® została oznaczona w badaniu 12 próbek kału, zakodowanych, aby zapobiec identyfikacji podczas testu. Badanie przeprowadzono w trzech niezależnych laboratoriach, gdzie próbki były badane przez 3 dni. Probki dały wyniki oczekiwane w 100% przypadków.

REAKTYWNOŚĆ KRZYŻOWA

Próbki kału, w których posiano szczepy poniższych mikroorganizmów o końcowych stężeniach 10⁸ lub więcej organizmów na ml nie reagowały ani z częścią antygenową ani z częścią toksyn w teście C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®:

Bakteria lub patogen: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium clostridiforme*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii* (nietoksynotwórcze), *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157 H7, *Escherichia coli* ETEC, *Klebsiella pneumoniae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquifaciens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

Jedynym organizmem innym niż *C. difficile*, który reagował w obszarze toksyn testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® było *Clostridium sordellii* VPI 9048. Ten szczep wytwarza toksyny HT i LT, które są homologiczne do, odpowiednio, toksyny A i B.

Następujące wirusy w ilości 10^{3.3} do 10^{8.25} jednostek TCID₅₀ na 0.2 ml nie reagowały w teście C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®:

Wirusy: Adenovirus typ 1,2,3,5,40,41; ludzki koronawirus, Coxsackievirus B2,B3,B4,B5, Echovirus 9,11,18,22,33, Enterovirus typ 68,69,70,71. Rotawirus.

SUBSTANCJE INTERFERUJĄCE

Następujące substancje (formuła U.S.) nie miały wpływu na wyniki testu, jeżeli obecne były w kale w podanych stężeniach: mucyna (3.5% w/v), krew ludzka (40% v/v), siarczan baru (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5 v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), kwas stearynowy/palmitynowy (40% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Vancomycin (0.25% w/v).

REAKCJE IZOLATÓW KLINICZNYCH OTRZYMANE NA AGARZE CYKLOSERYNOWO-CEFOKSYTYNOWO-FRUKTOZOWYM (CCFA)

Testem C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® przebadano 103 kliniczne izolaty *C. difficile*, otrzymane w wyniku trzydniowej anaerobowej hodowli bakteryjnej na CCFA, w 37°C. W celu analizy pobrano indywidualne kolonie i rozprowadzono do stanu zawiesiny za pomocą Rozcieńczalnika, tak jak zalecane jest dla próbek kału. Wszystkie 103 próbki w teście dały dodatnią reakcję antygenową. Siedemdziesiąt ze 103 izolatów (68%) pochodziło z próbek kału dodatnich na toksyny *C. difficile*, w badaniu hodowli tkankowej. Z tych 70 izolatów 56 (80%) dało dodatnią reakcję toksyn podczas badania wykonanego po hodowli anaerobowej na CCAF przez 3 dni w 37°C.

BIBLIOGRAFIA

1. Lyerly, D. M., H. C. Krivan, and T. D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. **1**:1-18.
2. Lyerly, D. M., K. E. Saum, D. K. MacDonald, and T. D. Wilkins. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. **47**: 349-352.
3. Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch, J. M. Ketley, T. J. Mitchell, J. Stephen, and G. E. Griffin. 1985. Host and microbial determinants of the spectrum of *Clostridium difficile* mediated gastrointestinal disorders. Microecol. Ther. **15**:231-236.
4. Lyerly, D. M., N. M. Sullivan, and T. D. Wilkins. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. J. Clin. Microbiol. **17**:72-78.
5. Laughon, B. E., R. P. Viscidi, S. L. Gdovin, R. H. Yolken, and J. G. Bartlett. 1984. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J. Infect. Dis. **149**: 781-788.
6. Lyerly, D. M., L. A. Barroso, and T. D. Wilkins. 1992. Characterization of a toxin A-/toxin B+ isolate of *Clostridium difficile*. Infect. Immun. **60**: 4633-4639.
7. Dove, C. H., S.-Z. Wang, S. B. Price, C. J. Phelps, D. M. Lyerly, T. D. Wilkins, and J. L. Johnson. 1990. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. Infect. Immun. **58**: 480-488.
8. Zheng, L., S. F. Keller, D. M. Lyerly, R. J. Carman, C. W. Genheimer, C. A. Gleaves, S. J. Kohlhepp, S. Young, S. Perez, and K. Ye. 2004. Multicenter Evaluation of a New Screening Test that Detects *Clostridium difficile* in Fecal Specimens. J. Clin. Microbiol. **42**:3837-3840.
9. Miles, B. L., J. A. Siders, and S. D. Allen. 1988. Evaluation of a commercial latex test for *Clostridium difficile* for reactivity with *C. difficile* and cross-reactions with other bacteria. J. Clin. Microbiol. **26**:2452-2455.
10. Lyerly, D. M., and T. D. Wilkins. 1986. Commercial latex test for *Clostridium difficile* Toxin A does not detect Toxin A. J. Clin. Microbiol. **23**:622-623.

DYSTRYBUTOR:

P.P.H.U. BOR-POL, 44-152 Gliwice, Plac Jaśminu 2,
tel./faks: (032) 270 61 35, (032) 237 86 21

www.borpol.com.pl

borpol@borpol.com.pl