

SIMPLE 2A-Bdiff / STICK 2A-Bdiff

Imunochromatografický test pro diferenciální průkaz
Toxinu A a Toxinu B z *C. difficile* v lidské stolici

TYTO POKYNY JE TŘEBA POZORNĚ PŘEČÍST
PŘED PROVÁDĚNÍM TESTU

ÚVOD:

2A-Bdiff imunochromatografické stanovení firmy Operon je rychlý test na kvalitativní průkaz Toxinu A (TcdA) a Toxinu B (TcdB) bakterie *Clostridium difficile* v lidské stolici, kde výsledek je vyhodnocován pomocí dvou oddělených linií. Pozitivní linie kteréhokoliv z toxinů v testu indikuje infekci *C. difficile* (CDI), kterou musí klinik zvážit.

Na rozdíl od jiných imunologických testů (ELISA, rychlé testy), které umožňují testování TcdA a TcdB současně a nerozlišují jednotlivé toxiny test OPERONU 2A-Bdiff umožňuje testovat najednou a odlišit oba toxiny za využití dvou různých linií na stripu – červený pod modrou kontrolou pro přítomnost TcdA a druhý červený nad kontrolní linií pro TcdB. (viz obr. 1),

Test je založen na imunologické vazbě barevných mikročastic, které procházejí membránou s imobilizovanými specifickými monoklonálními protilátkami proti TcdA a TcdB.

Předběžná diagnostika infekce *Clostridium difficile* (CDI):

C. difficile produkuje dva vysokomolekulární toxiny, toxin A a toxin B, které jsou hlavními faktory virulence způsobujícími klinické příznaky onemocnění CDI. Současné výzkumy^{1, 2}, prokázaly, že každý z nich samostatně způsobí onemocnění u křečků.

Předpokládá se, že *C. difficile* je příčinou až 25 % průjmů spojených s léčbou antibiotiky², včetně clindamycinu, druhé a třetí generace cefalosporinů, inhibitorů gyrázy, ampicillinu a amoxicillinu. K příznakům průjmu se navíc přidává pseudomembránová kolitida (PMC), kterou je třeba urgentně léčit antibiotiky, účinnými proti *C. difficile* (metronidazol, vancomycin), neboť bez léčby může být vážně ohrožen život pacienta.

Mortalita způsobená CDI je 6 % až 30 %, zvláště pokud pacient trpí PMC. Pacienti trpící CDI vzniklou na základě předchozí léčby mohou prodloužit pobyt v nemocnici o 6-10 dní a (zvýšit cenu hospitalizace z 6 na 8000 EUR).

C. difficile – charakteristika

Clostridium difficile je anaerobní gram-pozitivní sporulující bakterie, která může být přítomná asymptomaticky až v 5 % zdravé populace¹. Tento

poměr může stoupnout až na 30 % a je způsobený hospitalizací, léčbou antibiotiky, vůči kterým je bakterie rezistentní. Děti jsou brzo po narození osídleny *C. difficile*, ale ani intenzivní studie neprokázaly, že by trpěly nějakými klinickými příznaky. Současné diskuse svědčí o tom, že mají nedostatek střevních receptorů pro toxiny nebo je rozdíly v pH chrání před aktivitou toxinů. Jak bylo již zmíněno, *C. difficile* může produkovat různé toxiny⁴:

Toxin A (TcdA) (308 kDa) je nazýván enterotoxin, daný tím, že vyvolá úplné symptomy u zvířecího modelu – u křečků. TcdA také vykazuje vysokou cytotoxicitu, ale pouze u specifických TcdA senzitivních buněk jako HT-29⁵.

Toxin B (TcdB) (279 kDa) je klasifikován jako cytotoxin. Ve většině buněčných kultur v laboratoři (např. Vero, CHO nebo HeLa) má asi 1000krát vyšší potenciál než toxin A. TcdB sekvence aminokyselin se liší mezi kmeny⁶.

TcdA / TcdB detekční vzorec

Následující kmeny *C. difficile* jsou identifikovány na základě svých toxinů:

- **Netoxigenní kmeny** nejsou patogenní a neprodukují ani TcdA ani TcdB jednotlivě ani v kombinaci.
- **TcdA+ / TcdB+ kmeny** jsou nejběžnějšími původci CDO jejich ribotypy 001, 014 a 078 jsou nejběžnější v Evropě⁷.
- **TcdA- / TcdB+ kmeny** byly poprvé identifikovány Depitra kol. v Belgii⁸. Jsou pokládány za patogenní, přestože netvoří toxin A⁹. Do této skupiny patří ribotyp 017, který způsobuje četné endemické výskyty v severní Americe.
- **TcdA+ / TcdB-kmeny** byly objeveny díky možnosti testování jednotlivých antigenů ve stolici jednotlivými testy. Až dosud bylo nalezeno pouze velice málo izolátů těchto kmenů. Současné výsledky ukazují, že i TcdB mutant *C. difficile* může vyvolat CDI u křečků². Tyto výsledky předpokládají, že se tyto kmeny mohou vyskytovat i v klinických vzorcích.

ZÁKLADNÍ PRINCIPY TESTU

2A-Bdiff test používá kombinaci:

- 1) Červených latexových částic konjugovaných se specifickými protilátkami proti toxinu A z *C. difficile* které kooperují s jinými specifickými protilátkami pro toxin A, navázanými na testovací membráně pod kontrolní linií.
- 2) Červených latexových částic, konjugovaných se specifickými protilátkami proti toxinu B z *C. difficile* které kooperují s jinými specifickými protilátkami pro toxin B, navázanými na testovací membráně nad

kontrolní linií

3) Modré latexové částice konjugované antigenem jsou rozpoznány specifickými protilátkami pro tento antigen na membráně, sloužícími jako kontrolní linie.

V tomto testu jsou napřed ze vzorku pomocí dilučního pufru vzorku (součástí soupravy) extrahovány toxiny z fekálního matrixu. Po extrakci je určité množství supernatantu přidáno k reakčnímu stripu a 15 minut probíhá reakce.

Když extrahovaný vzorek prochází testovací membránou, barevné částice migrují. V případě pozitivního vzorku specifické protilátky přítomné v membráně zachytí barevné, antigenem coatované částice.

Vzor linií je použit pro interpretaci výsledku po inkubaci při pokojové teplotě 15 minut (viz obr.1)).

FORMÁT TESTU


Test 2A-Bdiff je dostupný ve dvou formátech:

Stick formát: reakční stripy jsou baleny jednotlivě v aluminiovém sáčku nebo v 25-kusové plastové zkumavce. Další testovací zkumavka (nebo 96-jamková mikrotitrační destička s plochým dnem) je potřeba pro uchování extrahovaného vzorku a provedení testu.

Simple formát: reakční strip je uvnitř plastové kazetky. Extrakty jsou přidány přímo do okénka pro vzorek, které je označené šipkou.

Oba formáty jsou založeny na stejném principu, přestože jsou některé rozdíly v pracovním postupu (viz odpovídající POSTUPY dále.)

MATERIÁL OBSAŽENÝ V SOUPRAVĚ

- Reakční proužky (Stick nebo Simple formát)
- Sample diluent Buffer (pufr-diluent vzorku) stejný pro test Simple/Stick GDH
- Jednorázová dělená plastická pipetka
- Jednorázové nedělené plastové pipetky (žlutá)
 BIOSIGMA S.r.l
Via Valenta 6- Zona Ina. Cantarana
30010 – Cona (VE) Italy
- Dřevěné aplikátory pro přenos pevného vzorku stolice
- 1,5 ml mikrozkušavky s víčkem
- Testovací zkumavky
- Stojánky pro držení předchozích testovacích zkumavek ve svislé poloze

MATERIÁL NEDODÁVANÝ V SOUPRAVĚ

- Centrifuga pro 1,5 ml mikrozkušavky
- Vortex
- Minutka / Časovač

Pro uživatele jsou dostupné kontroly pro validaci

získaných výsledků. Ty je možno objednat nezávisle, jako zvláštní položku.

UPOZORNĚNÍ

1. Se vzorky pacientů (stolice) je třeba nakládat jako s potenciálně infekčním materiálem. Je třeba používat všechny ochranné pomůcky (jednorázové ochranné rukavice, ochranné brýle, laboratorní plášť atd.)

2. Diluent vzorku obsahuje azid sodný jako antimikrobiální agens. Zabraňte přímému kontaktu s kůží a sliznicemi. Likvidujte odpovídajícím způsobem. V případě že pufr jeví znaky kontaminace nebo precipitace, nepoužívejte jej.

3. V místech, kde se pracuje s reagensy a vzorky, nejezte, nepijte, nekuřte, nepřipravujte a neskladujte jídlo.

4. Poté co práce skončila, odstraňte rukavice a hned dezinfikujte ruce alkoholovým dezinfekčním činidlem. Poté umyjte ruce mýdlem. Prostor, kde bylo prováděno testování ošetřete dekontaminačním roztokem ničícím spory, neboť spory *C. difficile* nejsou ničeny alkoholem.

5. Nezaměňujte komponenty mezi soupravami s rozdílným číslem šarže.

6. Před použitím vytemperujte reageny a vzorky; chladné reageny a vzorky mohou zhoršit kvalitu testu. Pro vytemperování na pokojovou teplotu stačí obvykle 20-30 minut.

7. Souprava je pouze pro použití in vitro.

8. Nepoužívejte soupravy po expiraci.

9. Pokud je vnější obal poškozený, je možné použít test, není-li poškozen obal jednotlivých komponent.

10. Při použití SIMPLE formátu (kazetky) je důležité přidat přesný objem extrahovaného vzorku do reakční jamky. Pokud je objem menší, imunochromatografie nemusí proběhnout pro malý objem vzorku, který se nedostane k reakční zóně. Pokud je objem příliš velký, můžou se objevit hnědé linie místo červené nebo modré.

11. Všechny výrobky jsou pro jedno použití a měly by být likvidovány v souladu s aktuální legislativou.

12. Nepoužívejte test, pokud se objeví jakákoliv barevná linie před prováděním testu.

13. Je důležité odebrat správné množství vzorku: ca 75 mg pevného vzorku (kulička o průměru 3 mm) nebo 75 µl tekutého nebo polotekutého vzorku. Tato množství jsou extrahována v 1 ml diluentu vzorku v soupravě. Pokud je větší množství vzorku, 75 mg (nebo 75 µl) v 1 ml diluentu je dostatečné.

Nadbytek vzorku vzhledem k diluentu vzorku brání reakci, aby proběhla správně, to je zvláště kritické u

pevných vzorků, ke je obtížné odhadnout vhodné množství. Mějte na zřeteli, že test 2A-Bdiff byl koncipován hlavně pro analýzu tekutých a polotekutých vzorků.

14. Je velice důležité ihned po vyjmutí potřebných proužků ze zásobní zkumavky uzavřít balení, neboť vlhkost může zničit nepoužité proužky.

15. Dokud jste nespotřebovali celou soupravu, nelikvidujte vnější obal. Obsahuje důležité informace o CE značení a notifikaci.

SKLADOVÁNÍ

Výrobek může být skladován při 2-30 °C.

Datum expirace je vytištěno na zkumavce nebo na aluminiovém obalu.

VZORKY

- tato souprava je určena pro testování vzorků tekuté nebo polotekuté lidské stolice. Pevné vzorky mohou být analyzovány nicméně průvodním znakem infekce *C. difficile* je diarrhoea.
- Netestujte vzorky odebrané do jakéhokoliv transportního nebo obohaceného media/jsou přidávány konzervační agens (formalin, SAF, PVA apod.), které mohou interferovat s testem.
- Doporučujeme analyzovat nezpracované stolice. Je-li třeba, vzorky mohou být skladovány v lednici při (+2-8 °C) maximálně 1-2 dny. Pro delší skladování je třeba zmrazit na -20 °C. Mějte ovšem na zřeteli, že některé vzorky se stanou kvůli zamražení negativní.
- Věnujte pozornost analýze hemoragických vzorků; pokud je vysoká koncentrace krve, často je falešně pozitivní výsledek. Jako indikátor nespecificity může sloužit i změna barvy modré kontrolní linie (zčervená nebo je netypicky velice tmavě modrá).
- Zmražené vzorky nechte před analýzou plně rozmraznout a vytemperovat na pokojovou teplotu.
- Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku z důvodu degradace toxinu.

PŘÍPRAVA VZORKU ZE STOLICE

Obecné poznámky: Během provádění testu je třeba používat všechny ochranné laboratorní prostředky z důvodu práce s infekčním materiálem. Po ukončení práce uklidte pracovní prostor podle bodu 4 v odstavci „Upozornění“.

Sample diluent Buffer (pufr pro ředění vzorku) je stejný pro test Simple/Stick A-Bdiff.

Pro oba formáty platí následující příprava vzorku stolice:

1. Pro tekuté nebo polo-tekuté vzorky přidejte pomocí žluté nekalibrované pipety **3 kapky (nebo 75 µl)** vzorku do 1,5 ml mikrozukavky.

Pokud je vzorek pevný, přeneste ca **75 mg** pevného

vzorku (kulička o průměru 3 mm) pomocí dřevěného aplikátoru do 1,5 ml mikrozukavky. Důležité: Ujistěte se, že vzorek je homogenní odběrem ze tří různých oblastí, aby se získal co nejrepresentativnější vzorek

2. Do této 1,5 ml mikrozukavky se vzorkem přidejte **1 ml** diluentu vzorku (nebo množství úměrné k 75 µl (nebo ca 75 mg) vzorku na 1 ml diluentu vzorku).

3. Vortexujte ca 30 vteřin nebo tak, aby byl vzorek zcela suspendován v pufru.

4. Mikrozukavku centrifugujte 5 min při 700xg (ca 3000rpm) v malé centrifuze pro mikrozukavky, aby došlo k usazení pevných částic. Pokud není centrifuga k dispozici, počkejte 3-5 min až se pevné mikročástice usadí na dně zkumavky. Optimálních výsledků ovšem dosáhnete při použití čirého roztoku vzorku po centrifugaci.

SIMPLE 2A-Bdiff POSTUP

Po přípravě vzorku pod výše uvedeného postupu pokračujte následovně:

- Vyjměte reakční kazetku z aluminiového obalu. Odvlhčovací sáček vyhoďte; pouze chrání proužek před vlhkostí.
- Po centrifugaci pomocí nové jednorázové žluté pipety přidejte **4 kapky (100 µl)** supernatantu vzorku na testovanou plochu (kulaté okénko označené šipkou).
- Po **15** minutách odečítejte výsledek

STICK 2A-Bdiff POSTUP

Po přípravě vzorku pod výše uvedeného postupu pokračujte následovně:

- Vyjměte reakční strip z aluminiového obalu nebo ze zásobní zkumavky (poté dobře znovu zavřete pro ochranu před vlhkostí).
- Pokud používáte zkumavky ze soupravy, vložte zkumavku do stojánku ze soupravy. Vezměte alikvot z centrifugovaného supernatantu vzorku: přibližný alikvot je **265 µl** (čtvrtá značka na stupňované jednorázové pipetě) a přeneste do testovací zkumavky
- Pokud používáte 96-jamkovou mikrotitrační destičku s plochým dnem, přeneste **150 µl** čistého supernatantu (třetí značka na stupňované jednorázové pipetě) a přeneste do testovací jamky
- Vložte strip do testovací zkumavky (ve stojánku) nebo do jamky mikrotitrační destičky šipkou směřující dolů.
- Inkubujte **15 minut** a poté odečítejte výsledky (obr.1).

ODEČÍTÁNÍ VÝSLEDKŮ:

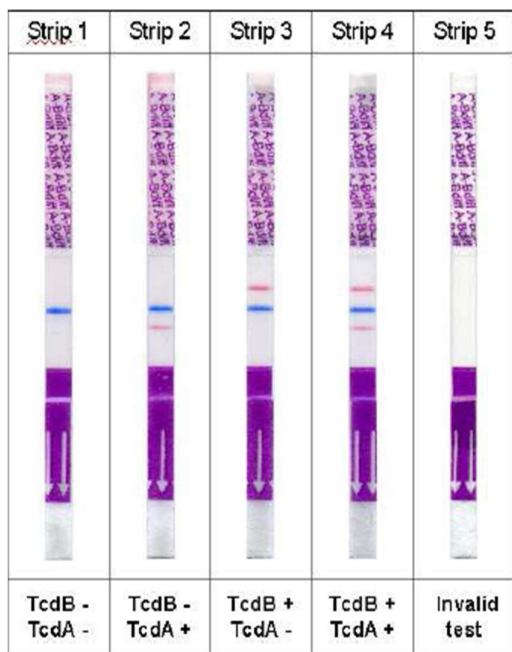
Pět proužků na obr. 1 představuje různé výsledky, které je možné získat při testování 2A-Bdiff.

Mohou se objevit 3 různé linie:

Modrá linie: kontrolní linie, která indikuje správné provádění testu.

Horní červená linie: TcdB pozitivní vzorek.

Dolní červená linie: TcdA pozitivní vzorek.



Modrá (kontrolní) linie by se měla na proužku objevit vždy. Další červená linie na proužku indikuje přítomnost *C. difficile*, které produkuje TcdA nebo TcdB v analyzovaném vzorku.

Obr. 1 Ukazuje možné vzory. Výsledky jsou vytištěny pod stripem.

Strip 1: NEGATIVNÍ výsledek. Vzorek neobsahuje *C. difficile* nebo obsahuje kmen, který neprodukuje TcdA/TcdB. Objeví se pouze jedna **MODRÁ** vodorovná linie ve středu reakční oblasti. (u Simple formátu je označená písmenem „C“ na kazetce). To je kontrolní linie a musí se objevit vždy jako indikátor správného průběhu reakce.

Stripy 2-4: POZITIVNÍ výsledek.

Strip 2: Detekce TcdA: Objeví se **MODRÁ** vodorovná linie a pod ní **ČERVENÁ** (u Simple formátu je označená písmenem „T1“ na kazetce).

Strip 3: Detekce TcdB: Objeví se **MODRÁ** vodorovná linie a pod ní **ČERVENÁ** (u Simple formátu je označená písmenem „T2“ na kazetce).

Strip 4: Detekce TcdA a TcdB současně: Objeví se **MODRÁ** (kontrolní) vodorovná linie dvě **ČERVENÉ** line (jedna nad [TcdB] a jedna pod [TcdA] modrou kontrolní linií. (u Simple formátu je označená písmenem „T1“ na kazetce

Strip 5: NEVALIDNÍ výsledek – NEHODNOTITELNÝ. Neobjeví se modrá vodorovná

kontrolní linie a modrá barva kontrolní linie je zřetelně odlišná (velice temně modrá nebo fialová) nebo nespecifické barvy **POZITIVNÍCH LINIÍ**. Jakákoliv jiná kombinace barev než vyznačených NA STRIPECH 1-4, znamená abnormální funkci testu. To může být způsobeno následujícími příčinami:

- * Jedna nebo více reagentů mohlo být zkaženo nebo test proexpiroval.
- * Vzorek nebyl dobře připravený dle pokynů
- * Vzorek obsahuje vysoké množství krve

V případě nevalidního výsledku se doporučuje použít jiný test, u kterého budou striktně dodrženy protokol popsany v manuálu. V případě vzorku s krví, pokud problém přetrvává, se doporučuje použít alternativní testovací metodu, neboť důvodem je spíše matrix než použitý strip. Ostatní komerčně dodávané soupravy pro rychlé restování dávají pro tyto vzorky s krví podobné výsledky.

- Jakákoliv linie, která se objeví později (než po 15 min.) nemá diagnostický význam.

POZNÁMKA: závěrečný definitivní diagnosa by měla být stanovena klinickým lékařem. Tento test pouze detekuje TcdA/TcdB *C. difficile* ve vzorku. Nezajišťuje, že pacient trpí infekcí *C. Difficile*.

VAROVÁNÍ: Doporučuje se zařazení kontrol o známém výsledku aby pro ověření správnosti výsledků.

OMEZENÍ TESTU

1. Test 2A-Bdiff analyzuje vzorky lidské tekuté a polotekuté stolice; mohou být použity i pevné vzorky, i když provedení testu pro ně není optimalizované. Ve velice vzácných případech byly toxiny objeveny i v pevné stolici.

2. Test je kvalitativní ne kvantitativní; přestože intenzita pozitivní linie odpovídá množství toxinu ve vzorku stolice

3. Pro validaci soupravy bylo použito více než 200 vzorků stolice. Byly zjištěny dobré korelace s jinými technikami (ELISA a Cytotoxicita). Nicméně tato studie nevylučuje interference v prováděných testů u jiných vzorků stolice.

4. Malé množství vzorku může vést k velice slabým pozitivním výsledkům. V tomto případě doporučujeme přetestovat s větším množstvím vzorku s doporučenými proporcemi dávek vzorku diluentu (viz. „Příprava vzorku“).

5. Nadbytek vzorku může způsobit signifikantně zpomalit vývoj stripu nebo chybnou funkci testu. (není viditelná kontrolní linie) V tomto případě je třeba test opakovat s menším množstvím vzorku. To je zejména

důležité u pevného vzorku stolice.

6. Negativní výsledek nevylučuje možnost infekce *C. difficile* (CDI). Výsledek testu musí být interpretován vzhledem ke klinickému obrazu pacienta. Navíc je třeba si uvědomit, že toxiny jsou nestabilní a lze je snadno degradovat třeba špatným skladováním vzorku nebo přítomností inhibitorů. Tak se může stát, že je koncentrace antigenu ve vzorku pod mezí detekce (viz „Analytická senzitivita“).

7. Pozitivní výsledek z pevné stolice by měl být interpretován velice opatrně. Principiálně je průjem hlavním symptomem onemocnění *C. difficile* (CDI), což vylučuje pevnou stolicí. Osoba provádějící test by o této skutečnosti měla informovat ošetřujícího lékaře. To v kombinaci se anamnézou pacienta umožňuje lékaři stanovit správnou diagnózu.

8. Byl zjištěn určitý stupeň zkřížené reakce se vzorky stolice silně pozitivními na přítomnost *Entamoeba histolytica*. Při testování izolovaného parazita (bez přítomnosti matrix – stolice) byla reakce negativní. Ostatní dostupné testy ELISA i rychlé, které jsou na trhu, vykazují pro tyto vzorky podobné výsledky.

9. Je pozorováno, že některé vzorky stolice s vysokým obsahem krve negativně interferují s testem. V těchto případech se mohou projevit problémy specifity u vzorků negativních *C. difficile*. Tato destabilizace testu je zpravidla doprovázena změnami barvy kontrolní linie; místo světle modré se objeví tmavě modrá až fialová (viz odstavec „Odečítání výsledků“).

10. Bylo popsáno osídlení *C. difficile* u více než 50 % dětí. Vysoké procento bylo také popsáno u pacientů s cystickou fibrózou. Obvykle tyto skupiny pacientů zůstávají asymptomatické a nevyžadují specifickou léčbu. Tyto pozitivní výsledky nemají klinický význam. Mělo by se s nimi zacházet s ohledem na pacienta a nevyžadují léčbu infekce *C. Difficile*.

ANALYTICKÁ SENZITIVITA

Za účelem stanovení analytické senzitivity 2A-Bdiff soupravy byly použity toxiny A a B z tgcBIOMiCs při různém ředění v diluentu vzorku. Mnohé vyráběné šarže detekují koncentraci 0,75 ng/ml obou toxinů.

DIAGNOSTICKÁ SENZITIVITA A SPECIFICITA

Průměrné hodnoty senzitivity a specifity soupravy 2A-Bdiff získané za všech hodnocení jsou:

Senzitivita: 97,4% Specifita: 96,1%
--

Souprava 2Bdiff vykazuje excelentní parametry

s hodnotami senzitivity a specifity nad 95%.

Dvě z prováděných hodnocení jsou níže:

A.-Externí hodnocení:

2A-Bdiff test (Operon) byl externě hodnocen ve španělské nemocnici měřením 150 negativních a 44 pozitivních vzorků srovnáním s referenční metodou Cytotoxicita. Všechny vzorky byly čerstvé.

Senzitivita: 92,5%

Specifita: 95,5%

B.- Interní hodnocení:

2A-Bdiff test byl interně hodnocen firmou OPERON. Bylo testováno 242 negativních a 105 pozitivních vzorků proti Cytotoxicitě testované v místě původu vzorků (různé španělské nemocnice). Všechny vzorky byly před testováním zmrazené.

Získané výsledky byly následující:

Senzitivita: 99,0%

Specifita: 96,3%

OPAKOVATELNOST

Byly použity purifikované toxiny společnosti ListLabs pro tvorbu křivky senzitivity z důvodu stanovení senzitivity soupravy 2A-Bdiff v různých podmínkách. Ředění bylo dvojnásobné a vzorky byly testovány jednou osobou v tripletech v jednom běhu. Výsledky se lišily v méně než faktoru 2, což značí vysokou přesnost testu.

REPRODUKOVATELNOST

SPOLEHLIVOST MEZI DNY

Za použití stejné šarže testu ve 4 různých dnech byla měřena křivka senzitivity. Výsledky byly vysoce reprodukovatelné pro oba toxiny TcdA a TcdB.

SPOLEHLIVOST V LABORATOŘI

Pět laborantů bez předchozího školení provádělo křivku senzitivity v duplikátech. Byly zřetelné rozdíly ve větších ředěních (slabší signály), ale nikdy nepřesáhly faktor 2.

SPOLEHLIVOST MEZI ŠARŽEMI

Za použití 3 různých šarží testu 2A-Bdiff byly měřeny křivky senzitivity v duplikátech. Analýza byla prováděna jedním laborantem v jednom dni.

Byly zjištěny rozdíly menší než faktor 2, což je akceptovatelné a tolerované pro prováděný test.

Rozdíly nalezené v různých částech odstavce „Reprodukovatelnost“ jsou akceptovatelné pro kvalitativní imunochromatografický test s inherentní variabilitou spojenou s touto metodou.

HOOK EFEKT

Některé publikace informují o případech vážných infekcí *C. difficile*, kdy koncentrace toxinů ve stolici je kolem 112 ng/ml¹¹. Pro hodnocení efektu velmi vysokých koncentrací toxinů vyšší než možné nalezení v populaci, byly testovány koncentrace 5000 ng/ml pomocí 2A-Bdiff soupravy. Tato koncentrace jsou asi 400x vyšší než LPC pro toxin A (12,5 ng/ml) a 1500 krát vyšší než LPC pro toxin B (3 ng/ml) a asi 40 krát vyšší než hladina toxinů nalezená u pacientů.

Nebyla zjištěna inhibice signálu v závislosti na zvyšující se koncentraci analytu.

INTERFERUJÍCÍ SUBSTANCE

V následující tabulce jsou uvedeny substance s jejich koncentracemi, které neovlivnily výsledky testu 2A-Bdiff po přidání ke stolici (negativní a pozitivní).

Racecadotril	5% (p/v)	Ibuprofen	20% (p/v)
Cimetidine	10% (p/v)	Acetylsalicylic acid	30% (p/v)
Loperamide	5% (p/v)	Edulcorant	5% (p/v)
Metronidazole	10% (p/v)	Palmitic acid	40% (p/v)
Omeprazole	3% (p/v)	Barium Sulfate	5% (p/v)
Ampicillin	15% (p/v)	Mucin	5% (p/v)

CROSS-REAKTIVITA S OSTATNÍMI MIKROORGANISMY

Tato studie byla prováděna na 2 různých místech:

▪ OPERON: 2A-Bdiff test byl hodnocen proti výrazně pozitivním vzorkům následujících mikroorganismů:

Adenovirus – Rotavirus – Norovirus – Astrovirus – Helicobacter pylori – Campylobacter jejuni – Escherichia coli O157 – Entamoeba histolytica – Giardia lamblia – Cryptosporidium parvum.

Určitý stupeň zkřížené reaktivity byl zjištěn u Entamoeba histolytica (viz bod 8 odstavce „Omezení testu“).

▪ NÁRODNÍ NEMOCNIČNÍ CENTRUM (Španělsko):

GDH test byl hodnocen proti různým mikroorganismům vyskytujícím se v gastrointestinálním traktu v dostatečně vysokých koncentracích. Testy byly prováděny na bakteriálních substancích o koncentraci 10⁸ cfu/ml. V žádné z uvedených případů nebyla zjištěna cross-reaktivita:

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli 1*, *Escherichia*

coli 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

ODKAZY - LITERATURA:

1. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN and Rood JI. *Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile*. Nature. Apr 2009, Vol: 458(7242) pp: 1176-1179.
2. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. *The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection*. Nature. Oct 2010, Vol: 467(7316) pp: 711-713.
3. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. *Costs of nosocomial Clostridium difficile associated diarrhoea*. J Hosp Infect. Sep 2008, Vol: 70(1) pp:15-20.
4. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyerly DM, Popoff MR, Rood JI, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD and von Eichel-Streiber C. *Revised nomenclature of Clostridium difficile toxins and associated genes*. J Med Microbiol. Feb 2005, Vol: 54(Pt 2) pp: 113-117.
5. Tucker KD, Carrig PE and Wilkins TD. *Toxin A of Clostridium difficile is a potent cytotoxin*. J Clin Microbiol. May 1990, Vol: 28(5) pp: 869-871.
6. Soehn F, Wagenknecht-Wiesner A, Leukel P, Kohl M, Weidmann M, von Eichel-Streiber C and Braun V. *Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of Clostridium difficile strain 8864--implications for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B*. Mol Gen Genet. May 1998, Vol: 258(3) pp: 222-232.
7. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E and Poxton I. European Study Group on Clostridium difficile (ESGCD). *Prospective study of Clostridium difficile infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates*. Clin Microbiol Infect. Nov 2007, Vol: 13(11) pp: 1048-1057.
8. Depitre C, Delmee M, Avesani V, L'Haridon R, Roels A, Popoff M and Corthier G. *Serogroup F strains of Clostridium difficile produce toxin B but not toxin A*. J Med Microbiol. Jun 1993, Vol: 38(6) pp: 434-441.
9. Drudy D, Harnedy N, Fanning S, Hannan M and Kyne L. *Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol. Aug 2007, Vol: 28(8) pp: 932-940.
10. von Eichel-Streiber C, Boquet P, Sauerborn M and Thelestam M. *Large clostridial cytotoxins--a family of*

glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. Trends Microbiol. Oct 1996, Vol: 4(10) pp: 375-382.

11. Alex B. Ryder, Ying Huang, Haijing Li, Min Zheng, Xiaobo Wang, Charles W. Stratton, Xiao Xu and Yi-Wei Tang. *Assesment of Clostridium difficile infections by quantitative detection of TcdB toxin by use of a real-time cell analysis system*. Journal of Clinical Microbiology, Nov 2010, pp: 4129-4134



Expirace



Číslo šarže



Pouze pro in vitro použití



Tento výrobek splňuje podmínky
Direktivy 98/79/EC pro in vitro
diagnostické zdravotnické prostředky.



Katalogové číslo



Přečtěte pokyny pro používání



Výrobce



Obsah stačí pro <n> testů



Skladujte při



Pozor



DO-0905107 Rev.09 (07.03.2019)



Operon, S.A. - Camino del Plano, 19-E-50410
Cuarte de Huerva - (Zaragoza) - ESPAÑA
Tel.: +34 976 503597