

## TECHLAB<sup>®</sup> C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE<sup>™</sup>

Rychlá membránová enzymová imunoanalýza pro společnou detekci antigenu glutamát dehydrogenázy *Clostridium difficile* a jeho toxinů A a B ve vzorcích stolice

Katalogové číslo T30525C (25 testů) nebo T30550C (50 testů)

Chráněno patentem: U. S. Patent #5,965,375 další patent přihlášen

---

### POUŽITÍ

TECHLAB<sup>®</sup> C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE<sup>™</sup> test je rychlá membránová enzymová imunoanalýza pro současnou detekci antigenu glutamát dehydrogenázy a toxinů A a B bakterie *Clostridium difficile* v jediné detekční kazetě. Test detekuje antigen, enzym glutamát dehydrogenázu jako indikátor přítomnosti *C. difficile* ve vzorcích stolice. Dále prokazuje u osob s podezřením na onemocnění způsobené *Clostridium difficile* přítomnost toxigenního kmene *C. difficile* detekcí jeho toxinů A a B. Je určen jako pomocný diagnostický test při podezření na onemocnění způsobeným *C. difficile*. Stejně jako u ostatních testů detekujících *C. difficile* je třeba výsledky vždy hodnotit v souvislosti s anamnézou a aktuálním klinickým stavem pacienta.  
POUZE PRO *IN VITRO* DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ.

### KLINICKÝ VÝZNAM

Po léčbě antibiotiky dochází u mnoha pacientů k výskytu gastrointestinálních obtíží různého stupně intenzity, od klinicky málo významných průjmů až po závažně probíhající pseudomembranózní kolitidu. Mnoho z případů lehčích forem postantibiotických gastrointestinálních obtíží a většina případů pseudomembranózní kolitidy je způsobena toxigenními kmeny bakterie *Clostridium difficile* (1). Jedná se o oportunní anaerobní bakterii, která se pomnožuje v tlustém střevě při potlačení většinové běžné střevní flóry působením podávaných antibiotik. Toxigenní kmeny *C. difficile* nesou geny kódující bakteriální toxiny, přičemž kmeny netoxigenní tyto geny nemají. Nástup onemocnění je vázán na produkci toxinů produkovaných toxigenními bakteriemi. Za primární příčinu klinických projevů spojených s onemocněním je považováno působení toxinu A, jež je střevní sliznici poškozujícím enterotoxinem (2,3). *C. difficile* zároveň produkuje druhý toxin označovaný jako toxin B. Tento toxin B je považován za bakteriální cytotoxin. Je v současné době v mnoha laboratořích detekován metodou tkáňových kultur. Toxigenní kmeny *C. difficile* produkují buď oba toxiny nebo jen toxin B (4-7). Enzym glutamát dehydrogenáza *C. difficile* je dobrým antigením markerem organismu ve stolici, protože je produkována ve velkém množství všemi kmeny bakterie nezávisle na jejich toxigenitě (8-10). Antigen může být prokázán ve vzorcích stolice použitím testu C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE<sup>™</sup>. Pozitivní výsledek testu na bakteriální glutamát dehydrogenázu *C. difficile* potvrzuje přítomnost organismu ve vzorku stolice, naopak negativní výsledek značí nepřítomnost organismu ve vzorku. Pozitivní výsledek testu pro toxiny A a B je potvrzením přítomnosti toxigenního kmene *C. difficile*.

## PRINCIP TESTU

*C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* test používá k detekci enzymu glutamát dehydrogenázy a toxinů A a B bakterie *C. difficile* specifické protilátky proti těmto antigenům. Testovací kazeta obsahuje *reakční okno* (Reaction Window) obsahující tři vertikální line s vázanými imobilizovanými protilátkami. Testovací linie antigenu (“Ag”) obsahuje protilátky proti enzymu glutamát dehydrogenáze *C. difficile*. Kontrolní linie (“C”) je tečkovaná čára obsahující protilátky proti křenové peroxidáze (HRP). Linie v místě detekce toxinů A a B (“Tox”) obsahuje specifické protilátky proti toxinům A a B *C. difficile*. Během testu vznikající *konjugát* obsahuje protilátky proti bakteriální glutamát dehydrogenáze a protilátky proti toxinům A a B s navázanou křenovou peroxidázou. Při provádění testu je nejprve vzorek přidán do zkumavky obsahující směs *konjugátu a diluentu*. Ředěná směs konjugátu se vzorkem je přidána do *aplikační jamky* (Sample Well) pro vzorek a pak je třeba testovací kazetu s aplikovaným vzorkem nechat 15 minut inkubovat při pokojové teplotě. V průběhu této inkubační doby dochází v přítomnosti glutamát dehydrogenázy a toxinů A a B k jejich vazbě na specifické protilátky, jež jsou součástí konjugátu s křenovou peroxidázou. Následně celý vzniklý komplex konjugát-antigen-protilátka migruje testovacím filtračním proužkem k membráně v reakční oblasti, kde dochází v místě detekčních linií k jejich vazbě s imobilizovanými specifickými protilátkami proti bakteriální glutamát dehydrogenáze a toxinům A a B. Do reakčního okna je aplikován promývací pufr (Wash Buffer) a následně substrát. Po desetiminutové inkubaci je nejprve hodnocena vizuálně reakce antigenu “Ag”, kdy je průkazným pozitivním výsledkem testu objevení modré linie v oblasti reakce antigenu “Ag” reakčního okna (Reaction Window). Pokud je průkaz antigenu “Ag” pozitivní, je poté třeba vyhodnotit reakci v oblasti reakce toxinů “Tox”. Zde je opět pozitivním výsledkem testu objevení modré linie v příslušné “Tox” části reakčního okna (Reaction Window).

Pozitivní reakce v kontrolní oblasti “C” vyjádřená objevením tečkované vertikální linie v části označené “C” reakčního okna (Reaction Window) je potvrzením, že test proběhl správně a výsledky je možno považovat za validní.

## REAGENCIE A POSKYTOVANÝ MATERIÁL

- |         |      |  |
|---------|------|--|
| MEM     | DEV  | <b>Testovací kazeta</b> – každý ochranný obal obsahuje 1 kazetu  |
| DIL     | SPE  | <b>Diluent</b> (22 ml v lahvičce) – roztok pufovaného proteinu s kalibrovaným kapátkem   |
| WASH    | REAG | <b>Promývací pufr</b> (Wash Buffer; 12 ml v lahvičce) – roztok pufru s kalibrovaným kapátkem   |
| SUBS    | REAG | <b>Substrát</b> (3,5 ml v lahvičce) – roztok obsahující tetrametylenbenzidin   |
| CONJ    | ENZ  | <b>Konjugát</b> (2,5 ml v lahvičce) – myší monoklonální specifické protilátky proti glutamát dehydrogenáze vázané s křenovou peroxidázou a kozími polyklonálními specifickými protilátkami proti toxinům A a B vázané s křenovou peroxidázou v roztoku pufovaného proteinu |
| CONTROL | +    | <b>Pozitivní kontrola</b> ( 1ml v lahvičce) – antigen v roztoku pufovaného proteinu  |
- Jednorázové plastové pipety** – s vyznačenou kalibrovací objem pro 25 µl, 400 µl a 500 µl

**POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ KITU**

*Malé testovací zkumavky (např. mikrozksamavky typu Eppendorf či skleněné zkumavky)*

*Vortex*

*Pipeta se špičkami*

*Aplikační tyčinky*

*Stopky*

*Jednorázové rukavice pro manipulaci se vzorky stolice*

**SKLADOVÁNÍ A STABILITA**

Datum expirace balení je uvedeno na obale. Data expirace jednotlivých komponent balení jsou uvedena na jejich etiketách. Balení je třeba uchovávat při teplotách v rozmezí mezi 2°C a 8°C.

**BEZPEČNOSTNÍ POKYNY**

1. Nezaměňujte či nevyměňujte jednotlivá činidla z různých balení. Nepoužívejte balení po uplynutí data expirace.
2. Před prováděním testu nechte temperovat všechny jeho komponenty PŘI POKOJOVÉ TEPLOTĚ (15-30°C).
3. Uzávěry, špičky a kapátka jsou pro jasné odlišení různě barevně označeny, NIKDY je vzájemně nezaměňujte či nevyměňujte.
4. Nemrazte činidla. Balení je třeba uchovávat při teplotách v rozmezí mezi 2°C a 8°C.
5. Ochranný obal obsahující testovací kazetu je před otevřením třeba ponechat při pokojové teplotě a otevřít až těsně před provedením testu. Je třeba, aby testovací kazety byly před užitím suché.
6. Pro dosažení optimálních výsledků testujte odebrané vzorky stolice do 72 hodin od odběru. Vzorky, které byly zmrazeny mohou ztratit svou aktivitu a může dojít k ovlivnění výsledků testu. Pokud používáte zmrazené vzorky, vždy je nutné ponechat vzorky roztát a temperovat na pokojovou teplotu.
7. Nepoužívejte vzorky stolice, kde byl jako konzervant použit 10% formol, methiolát formol, formol - acetát sodný či polyvinyl alkohol.
8. Vzorky v transportním mediu jako je Cary Blair či C&S médium mohou být použity dle protokolu pro přípravu vzorku.
9. Všechny lahvičky s činidly při aplikaci držte ve vertikální poloze pro dosažení konzistentní velikosti aplikovaných kapek a jejich správného objemu.
10. Se všemi vzorky a testovacími kazetami zacházejte jako s potenciálně infekčními a dodržujte veškerá bezpečnostní opatření pro manipulaci s biologickými vzorky. Zajistěte také řádnou likvidaci těchto vzorků. Při manipulaci se vzorky používejte ochranné rukavice.
11. Testovací kazety jsou určeny pouze k jednorázovému použití.
12. Senzitivita a specifita testu byla optimalizována pro pracovní postup uvedený v návodu k použití. Změna v uvedeném pracovním postupu či testovacích podmínkách může ovlivnit senzitivitu a specifitu testu. Dodržujte proto doporučený pracovní postup.
13. Mikrobiální kontaminace činidel může snižovat přesnost eseje. Předcházejte možné mikrobiální kontaminaci činidel používáním sterilních jednorázových pipet při pipetování činidel z lahviček.
14. Dbejte na dodržení správných časových intervalů při testování více než jednoho vzorku stolice. Do všech zkumavek nejprve přidejte *diluent* a poté teprve přidejte

*konjugát* do každé ze zkumavek s *diluentem*. Následně do každé zkumavky obsahující směs *diluent/konjugát* přidejte vzorek stolice. Důkladně promíchejte všechny takto naředěné vzorky a poté přeneste na testovací kazetu. Teprve po aplikaci ředěné směsi vzorek-konjugát do poslední testovací kazety začnete měřit čas patnáctiminutového kroku inkubace.

15. Pokud dojde k barevné změně činidla *substrátu* na tmavě modrou či fialovou kontaktujte svého lokálního dodavatele či volejte centrum technické podpory pro nutnost výměny činidla.

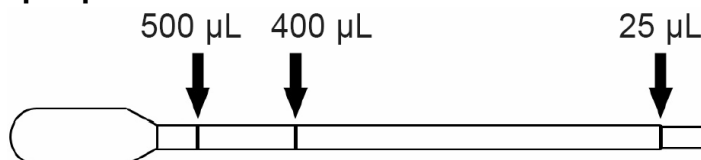
### ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE SE VZORKY STOLICE

1. Pro odběr a manipulaci se vzorky stolice jsou vhodné standardně užívané metody odběru stolice. Vzorky je po odběru třeba uchovávat při teplotách v rozmezí 2°C a 8°C. K testování používejte, pokud je to možné, vzo rky, jež byly odebrány nejdéle před 24 hodinami.
2. Pokud není možné provedení testu do 72 hodin od odběru, uchovávejte vzorky zmražené při teplotě ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ). V tomto případě je však nutné brát zřetel na fakt, že procesy mražení a tání vzorku mohou vést ke ztrátě aktivity díky degradaci bakteriálních toxinů. Pokud používáte zmražené vzorky, vždy je nutné ponechat vzorky roztát a temperovat na pokojovou teplotu.
3. PŘED prováděním eseje se ujistěte, že vzorky stolice jsou důkladně promíchány.
4. Uchovávání vzorků stolice ve směsi s *diluentem* NENÍ doporučeno.
5. Vzorky stolice nesmí být ponechány ve směsi *diluentu a konjugátu* po dobu delší než 24 hodin.

### PŘÍPRAVA VZORKU

1. Před prováděním testu ponechte všechny činidla a požadovaný počet testovacích kazet při pokojové teplotě, aby došlo k vyrovnání jejich teploty s okolím.
2. Připravte pro každý testovaný vzorek jednu malou zkumavku označenou údaji pacienta a dle potřeby pro požadované externí kontroly.
3. Pomocí černě značeného kapátka s vyznačenými kalibračními ryskami přidejte 750  $\mu\text{l}$  ( 2 vyznačená linie od špičky kapátka) *diluentu* do každé zkumavky připravené pro vzorky stolice. U vzorků v transportním médiu jako je Cary Blair či C&S médium přidejte do zkumavky pouze 650  $\mu\text{l}$  *diluentu*.
4. Přidejte jednu kapku *konjugátu* (z lahvičky s červeným uzávěrem) do každé zkumavky.
5. Nyní si připravte pro každý vzorek jednu jednorázovou plastovou pipetu (dodávány jako součást balení). Pipety mají na sobě vyznačeny ryskami objemy 25  $\mu\text{l}$ , 400  $\mu\text{l}$  a 500  $\mu\text{l}$ .

#### Kalibrovaná pipeta pro přenos vzorku:



6. Promíchejte důkladně všechny vzorky stolice nezávisle na jejich konzistenci. Je velmi důležité, aby byly vzorky řádně a stejnoměrně homogenizovány před jejich aplikací do testovací kazety.

**Tekuté /Semisolidní vzorky stolice** – Nasajte 25 µl vzorku do kalibrované pipety (s kalibrovanými vyznačenými ryskami pro objemy 25 µl, 400 µl a 500 µl) a následně přeneste do směsi *diluentu a konjugátu*. Nyní pomocí stejné pipety promíchejte zředěný vzorek.

**Formované/Solidní vzorky stolice** – Je třeba dbát na to, aby bylo aplikováno správné množství formované stolice do směsi. Nejprve vzorek důkladně promíchejte pomocí dřevěné aplikační tyčinky a poté tyčinkou přeneste malou porci stolice (přibližně o průměru 2mm, ekvivalent objemu 25 µl) vzorku do směsi *diluentu a konjugátu*. Pomocí aplikační tyčinky vzorek stolice následně ve směsi suspendujete.

**Vzorky stolice v transportních médiích (Cary Blair nebo C&S transportní média)** - přeneste pomocí pipety 100 µL (odpovídající množství 2 kapek z kalibrované pipety) vzorku do směsi *diluentu a konjugátu*.

#### 7. Volitelné vzorky pro provedení externí kontroly:

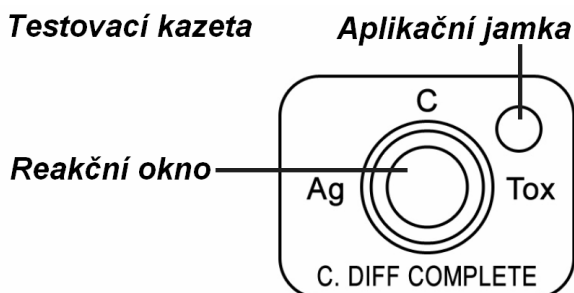
**Externí pozitivní kontrola** – přidejte jednu kapku z lahvičky s *pozitivní kontrolou* (lahvička se šedým uzávěrem) do příslušné testovací zkumavky.

**Externí negativní kontrola** - přidejte 25 µL *diluentu* do příslušné testovací zkumavky.

*POZNÁMKA: Pokud dojde k přenesení příliš malého vzorku stolice či nedokonalému promíchání, nevznikne homogenní suspenze ve směsi diluentu. Tento fakt může být příčinou falešně negativních výsledků testu. Naopak jestliže je aplikováno velké množství vzorku stolice, může dojít k chybným výsledkům způsobených omezeným či žádným vzlínáním vzorku testovací membránou.*

## PRACOVNÍ POSTUP

1. Pro každý testovaný vzorek stolice si připravte jednu testovací kazetu a dále dle potřeby jednu kazetu pro provedení externí pozitivní kontroly a jednu pro provedení negativní kontroly. Před prováděním testu ponechte testovací kazetu v ochranném obalu při pokojové teplotě. Poté obal otevřete, řádně označte každou kazetu pacientovými údaji a položte na rovný povrch orientovanou tak, že nápis "C. DIFF COMPLETE" je na spodní straně kazety a malá aplikační jamka se nachází v pravém horním rohu testovací kazety.



2. Uzavřete každou ze zkumavek obsahujících ředěný vzorek a důkladně promíchejte. Řádného promíchání lze dosáhnout použitím vortexu nebo otáčením zkumavky. Jakmile dojde k naředění vzorku pacienta či *pozitivní kontroly* směsí *diluentu a konjugátu*, lze takto vzorek ponechat inkubovat před aplikací do testovací kazety při pokojové teplotě po libovolně dlouhou dobu nepřesahující 24 hodin.

3. Použitím nové kalibrované pipety přeneste 500 µl naředěné směsi konjugátu se vzorkem do **aplikační jamky (Sample Well)** (menší otvor v pravém horním rohu) testovací kazety (*Membrane Device*) a ujistěte se, že veškerý obsah pipety se vsáknul do absorpčního polštářku uvnitř testovací kazety. Při aplikaci vzorku do aplikační jamky se snažte, aby špička pipety směřovala směrem k reakčnímu oknu (*Reaction Window*) (větší otvor ve středu testovací kazety).
4. Ponechte nyní kazetu při pokojové teplotě inkubovat po dobu 15 minut – vzorek se postupně vsakuje do membrány uvnitř kazety a v reakčním okně (*Reaction Window*) lze pozorovat postupné vlhnutí membrány při vzlínání vzorku.

### **POZNÁMKA KE VZORKŮM, U NICHŽ NEDOCHÁZÍ KE VZLÍNÁNÍ MEMBRÁNOU:**

*Sporadicky může docházet k situaci, kdy ředěný vzorek stolice nemůže být testován, protože dochází k zanesení pórů membrány a reakční okno kazety není dostatečně zvlhčeno vzorkem. V případě, že ředěný vzorek stolice nevzlíná membránou důkladně do 5 minut od aplikace vzorku do aplikační jamky (to znamená, že se membrána v reakčním okně nejeví dostatečně vlhká), přidejte 100 µl (4 kapky) diluentu do aplikační jamky a prodlužte inkubaci vzorku o dalších 5 minut (do celkové doby 20 minut).*

5. Po inkubaci přidejte 300 µl promývacího pufru (*Wash Buffer*) do reakčního okna kazety (**Reaction Window**) pomocí kalibrovaného bílé označeného kapátka (či ekvivalentním kapátkem). Ponechte promývací pufr (*Wash Buffer*) plně a rovnoměrně vsáknout do membrány reakčního okna (*Reaction Window*).
6. Přidejte 2 kapky *substrátu* (lahvička s bílým uzávěrem) do reakčního okna kazety (**Reaction Window**). Po 10 minutách odečtěte a zaznamenejte výsledky vyšetření.

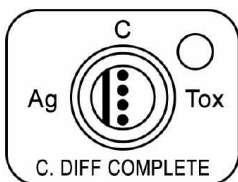
### **INTERPRETACE VÝSLEDKŮ**

1. Interpretace výsledků testu je nejspolehlivější pokud jsou hodnoceny okamžitě na konci reakční periody, tedy po uplynutí 10 minut. Výsledky odečítejte v běžné pracovní vzdálenosti v dobře osvětleném prostředí. Výsledek hodnotte pohledem směřujícím kolmo k testovací kazetě.
2. Objevení linie modrých teček ve střední části reakčního okna představuje interní pozitivní kontrolu testu. Pokud dojde k objevení alespoň jedné tečky je možno považovat interní kontrolu za validní. Dále hodnotte výskyt modrých linií na obou stranách reakčního okna kazety, kde dochází ke stanovení antigenu "Ag" a toxinů "Tox" v testovacích liniích. Intenzita zabarvení linií se může lišit (od světlé až po tmavou).
3. **Pozitivní výsledek průkazu antigenu ("Ag"):** Pozitivní výsledek průkazu antigenu může být hodnocen okamžitě při objevení linie kdykoli v intervalu deseti minut po přidání *substrátu*. Při pozitivním průkazu antigenu dojde k objevení modré linie v oblasti stanovení antigenu "Ag" a zároveň ve středu kazety tečkované kontrolní linie pod písmenem "C" (viz obrázek 1a). Intenzita zabarvení linie se může lišit (od světlé až po tmavou). Při objevení zřetelné, ale neúplné linie, je výsledek třeba hodnotit jako pozitivní. Pouhé diskrétní změny zabarvení membrány nelze hodnotit jako pozitivní výsledek. Pozitivní výsledek prokazuje přítomnost *C. difficile* ve vzorku.
4. **Pozitivní výsledek průkazu antigenu a toxinu ("Tox"):** V případě, že odečete pozitivní výsledek průkazu antigenu (to znamená je viditelná modrá linie v oblasti "Ag" a tečkovaná modrá linie pod písmenem "C") můžete pokračovat v hodnocení výsledků průkazu toxinů. Pozitivní výsledek průkazu toxinů může být odečítán okamžitě při

objevení linií kdykoli v intervalu deseti minut po přidání *substrátu*. Pozitivním výsledkem průkazu toxinu je objevení modré linie v oblasti stanovení toxinů "Tox" (viz obrázek 1b). Intenzita zabarvení linie se může lišit (od světlé až po tmavou). Při objevení zřetelné, ale neúplné linie, je výsledek třeba hodnotit jako pozitivní. Pouhé diskrétní změny zabarvení membrány nelze hodnotit jako pozitivní výsledek. Pozitivní výsledek prokazuje přítomnost toxinu *C. difficile* ve vzorku.

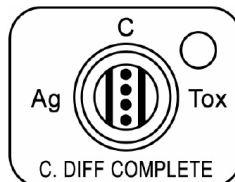
5. **Negativní výsledek:** Výsledek testu nelze hodnotit jako negativní či chybný dříve než po uplynutí 10 minut od přidání *substrátu*. Při negativním výsledku testu dojde ve středu kazety k objevení tečkované kontrolní linie pod písmenem "C" a nezobrazí se ani jedna linie v detekčních oblastech kazety (označených "Ag" a "Tox") (viz obrázek 1c). Negativní výsledek v oblasti detekce antigenu značí, že buď ve vzorku není přítomen antigen *C. difficile* a nebo je jeho množství pod detekčním limitem testu. Negativní výsledek v oblasti detekce toxinů značí, že buď ve vzorku není přítomen toxin *C. difficile* a nebo je jeho množství pod detekčním limitem testu.
6. **Chybný výsledek:** Nezobrazí se žádné linie v oblasti reakčního okna (viz obrázek 1d). Výsledek testu také nelze hodnotit pokud nedojde k zobrazení modré tečkované linie v kontrolní oblasti pod písmenem "C" po uplynutí 10 minut od přidání *substrátu* (viz obrázky 1e, 1f, 1g).
7. U malého procenta vzorků může dojít k pozitivnímu výsledku detekce toxinu, ale negativnímu výsledku detekce antigenu. V tomto případě je výsledek testu třeba považovat za nejasný a je vhodné zopakovat test s čerstvým vzorkem stolice ( viz obrázek 1h).

#### OBR 1: INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™*



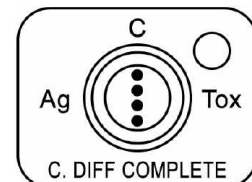
Obr 1a

Pozitivní výsledek průkazu antigenu



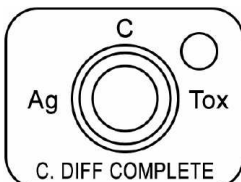
Obr 1b

Pozitivní výsledek průkazu antigenu a toxinu



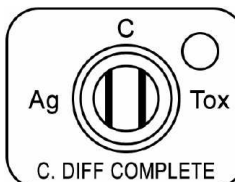
Obr 1c

Negativní výsledek



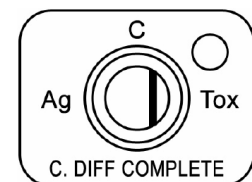
Obr 1d

Chybný výsledek



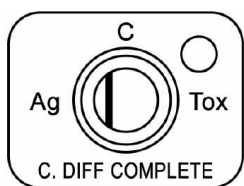
Obr 1e

Chybný výsledek

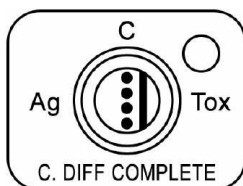


Obr 1f

Chybný výsledek



Obr 1g  
Chybný výsledek



Obr 1h  
Interpretace viz str.9

## KONTROLA KVALITY

**Interní:** Ve středu reakčního okna každé použité testovací kazety musí být viditelná pod písmenem “C” modrá tečkovaná linie. Objevení modrých teček v kontrolní oblasti potvrzuje, že vzorek a jednotlivá činidla byla správně aplikována, činidla byla v době testu aktivní a že došlo k dostatečnému vsáknutí a migraci vzorku testovací membránou kazety. Nezbarvené pozadí v reakčním okně kazety je interní negativní kontrolou. V případě, že byl dodržen správný pracovní postup a činidla fungovala řádně pozadí zůstane bílé umožňující tak bezproblémový odečet výsledku testu.

**Externí:** Správnou reaktivitu balení testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* je vhodné ověřit provedením externích pozitivních (přiloženou *pozitivní kontrolou*) a negativních (*diluentem*) kontrol a jejich výsledky zaznamenat. *Pozitivní kontrola* (lahvička s šedým uzávěrem) je dodávána jako součást balení *Pozitivní kontrola* potvrzuje správnou reaktivitu ostatních činidel použitých při esaji, ale není určena pro hodnocení hranice analytické citlivosti esaje. Jako externí negativní kontrola je použit samotný *diluent*. Další případné potřebné kontroly kvality je třeba provádět v souladu s místními doporučeními či požadavky akreditačních organizací.

## OMEZENÍ

1. The *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* je určen k detekci bakteriálního antigenu *C. difficile* a jeho toxinů ve vzorcích stolice. Test s pozitivním výsledkem potvrzuje přítomnost toxinu ve stolici. Interpretace tohoto výsledku je vždy nutná až na základě odborného posouzení ve spojení s anamnézou a klinickým stavem pacienta. Test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* je schopný detekce hladin koncentrací toxinu A  $\geq 0,63$  ng/ml, toxinu B  $\geq 0,16$  ng/ml a hladin enzymu glutamát dehydrogenázy  $\geq 0,8$  ng/ml.
2. Vzorky stolice jsou velmi komplexní biologický materiál. Proto jsou získané výsledky optimální při provedení testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* v době kratší než 24 hodin od odběru vzorku. Většina neředěných vzorků stolice může být uchovávána při teplotách v rozmezí 2°C - 8°C po dobu 72 hodin, kdy ještě ve většině případů nedochází k významné degradaci toxinů. Pokud není možné provedení testu v této periodě, je možné zmrazení a následné rozmrazení vzorků. Avšak v tomto případě je třeba počítat s faktem, že tyto procesy mohou způsobit ztrátu imunoreaktivity přítomných antigenů a toxinu A a B.
3. U některých vzorků může docházet při testu k slabým reakcím. Tato skutečnost může být zapříčiněna mnoha různými faktory jako je přítomnost nízkých koncentrací antigenu a/či toxinů, přítomnost látek vázajících antigeny či inaktivujících enzymů ve vzorku stolice. *Za těchto okolností je vhodné použít k testu vzorek čerstvě odebrané*



stolice. Současně lze současně s testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* pro potvrzení výsledků provést kultivaci s testováním toxigenity či další eseje detekující cytotoxicitu kmenu *C. difficile* a produkci jeho toxinů.

4. Vzorky stolice konzervované pomocí látek jako je 10% formol, methiolát formol, formol - acetát sodný či polyvinyl alkohol nelze pro testování použít.
5. Test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* je testem kvalitativním a tudíž nelze brát při hodnocení výsledků zřetel na intenzitu zbarvení detekčních linií.
6. Některé kmeny bakterie *C. sordellii* mohou při testování testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* poskytovat pozitivní výsledky vzhledem k produkci imunologicky podobných toxinů (1).
7. U kojenců je až v 50% případů popisována kolonizace kmenu *C. difficile*. Vysoké procento je také popisováno u pacientů s cystickou fibrózou (1,3).
8. Jediným organismem jiným než je *C. difficile* vykazujícím reaktivitu v detekční oblasti pro toxiny byl kmen *Clostridium sordellii* VPI 9048. Tento kmen produkuje velké množství HT a LT toxinů, které jsou homologní s toxiny A a B *C. difficile*.

## KLINICKÉ POZNÁMKY

Onemocnění způsobené *Clostridium difficile* je primárně nosokomiální nákazou dospělých pacientů a frekvence výskytu onemocnění je závislá na faktorech jakými jsou složení populace pacientů, typ zdravotnického zařízení a epidemiologická situace. Udávaná incidence onemocnění způsobených *C. difficile* u pacientů s postantibiotickými průjmy se může pohybovat v rozmezí 5 až 20%, avšak v nemocnicích mohou být hodnoty vzhledem k lokální epidemiologické situaci i mimo toto rozmezí. Každý výsledek testu je třeba vždy posoudit společně s klinickým stavem pacienta, protože někteří zdraví dospělí jedinci a velké procento (až 50 %) kojenců má pozitivní výsledek při testování toxinu *C. difficile*. U pacientů s cystickou fibrózou se udávaná hodnota nosičství *C. difficile* pohybuje mezi 22% a 32% (1,3). Při provádění klinických studií hodnotících charakteristiky testu byla u symptomatických pacientů prokázána produkce toxinů A a B u 12% pacientů a přítomnost glutamát dehydrogenázy u 18% pacientů. Pozitivní výsledek testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* v části kazety detekující antigen potvrzuje přítomnost bakterie *C. difficile* ve vzorku stolice; negativní výsledek znamená nepřítomnost organismu. Pozitivní výsledek testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* v části kazety detekující toxiny potvrzuje přítomnost toxinu bakterie *C. difficile* ve vzorku stolice; negativní výsledek značí nepřítomnost toxinu či nízké koncentrace nedostatečné pro jeho detekci.

## CHARAKTERISTIKY TESTU

### Klinické hodnocení části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™*

Část testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* detekující antigen byla srovnávána s kultivační metodou. Vzorky zahrnuté do studie byly odeslány do laboratoří k rutinnímu vyšetření. Kultivační metody byly prováděny dle laboratorních standardních postupů. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Tabulka 1. Shrnutí charakteristik testu při srovnání *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* s kultivační metodou**

n = 1126	Pozitivní kultivace bakteriální kultury	Negativní kultivace bakteriální kultury
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Pozitivita antigenní linie	201	62
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Negativita antigenní linie	21	842

		95% interval spolehlivosti
Senzitivita	90,5%	85,7-93,9
Specifická	93,1%	91,2-94,7
Pozitivní prediktivní hodnota	76,4%	70,7-81,3
Negativní prediktivní hodnota	97,6%	96,2-98,4
Korelace	92,6%	91,8-93,4

Vzorky s diskrepantními nálezy byly ověřovány ELISA testy detekujícími glutamát dehydrogenázu *C. difficile*. Ze 62 falešně pozitivních vzorků bylo 29 vzorků pozitivních při ověřování těmito ELISA testy a byly následně považovány za skutečně pozitivní.

Z 21 falešně negativních vzorků bylo 13 vzorků negativních i při ověření ELISA testy a byly považovány za skutečně negativní.

Část testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* určené k detekci antigenu byla srovnávána s esejí na tkáňových kulturách určených pro detekci toxinu *C. difficile*. Vzorky zahrnuté do studie byly odeslány do laboratoře k rutinnímu vyšetření. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2. V části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* detekující antigen došlo ke správné identifikaci 98.7% kultivačně pozitivních vzorků.

**Tabulka 2. Shrnutí charakteristik testu při srovnání *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* s esejí na tkáňových kulturách**

n = 1126	Pozitivní kultivace tkáňové kultury	Negativní kultivace tkáňové kultury
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Pozitivita antigenní linie	154	109
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Negativita antigenní linie	2	861

**Klinické hodnocení části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* detekující toxiny A a B**

Část testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* detekující antigen byla srovnávána s esejí na tkáňových kulturách ve dvou klinických laboratořích a v laboratoři firmy TECHLAB®, Inc. Vzorky zahrnuté do studie byly odeslány do laboratoří k rutinnímu vyšetření. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3. Shrnutí charakteristik testu při srovnání *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* s esejí na tkáňových kulturách**

n = 1126	Pozitivní kultivace tkáňové kultury	Negativní kultivace tkáňové kultury
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Pozitivita linie toxinu	137	6
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Negativita linie toxinu	19	964

		95% interval spolehlivosti
Senzitivita	87,8%	81,4-92,3
Specifická	99,4%	98,6-99,7
Pozitivní prediktivní hodnota	95,8%	90,7-98,3
Negativní prediktivní hodnota	98,1%	96,9-98,8
Korelace	97,8%	97,6-98,0

Vzorky s diskrepantními nálezy byly ověřovány ELISA testy detekujícími toxiny A and B *C.difficile*.

Pět ze šesti falešně pozitivních vzorků bylo pozitivní při průkazu toxinu testy ELISA a byly následně považovány za skutečně pozitivní. Z 19 falešně negativních vzorků bylo 12 negativních při průkazu toxinu testy ELISA a byly následně považovány za skutečně negativní.

## **VLIV KONZISTENCE VZORKŮ STOLICE**

### **Efekt konzistence vzorků stolice na průběh testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™***

Dosažené výsledky testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* při testování vzorků stolice o různé konzistenci jsou pro část kazety detekující antigen (n=978) uvedeny v Tabulce 4 a pro část detekující toxin (n=981) v Tabulce 5. Procentuální zastoupení pozitivních reakcí bylo shodné pro všechny tři skupiny vzorků stolice rozdělených dle konzistence (tekuté, semisolidní, solidní) a to stejně tak při testování testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* jako při provádění klasických metod kultivací. Všechny vzorky byly testovány na přítomnost *C. difficile*. Podmínkou pro indikaci k vyšetření byl klinický stav pacienta, nikoliv konzistence vzorku stolice. Při provádění testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* bylo v části kazety detekující antigen dosaženo shodných výsledků jako při kultivačním vyšetření nezávisle na konzistenci zkoumaného vzorku stolice. V části kazety detekující toxin testu bylo testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* dosaženo shodných výsledků jako při provádění tkáňové kultivace nezávisle na konzistenci použitého vzorku stolice.

**Tabulka 4. Výsledky získané při detekci antigenu testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* u vzorků stolice o různé konzistenci**

Počet vzorků (n=978)	Tekuté vzorky (n=335)	Polo-pevné vzorky (n=522)	Pevné vzorky (n=121)
Pozitivní kultivace bakteriální kultury	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Pozitivita antigení linie	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negativní kultivace bakteriální kultury	276(82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Negativita antigení linie	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

**Tabulka 5. Výsledky získané při detekci toxinu testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* u vzorků stolice o různé konzistenci**

Počet vzorků (n=978)	Tekuté vzorky (n=336)	Polo-pevné vzorky (n=523)	Pevné vzorky (n=122)
Pozitivní tkáňová kultivace	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Pozitivita linie toxinu	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negativní tkáňová kultivace	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (84,3%)
<i>C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™</i> Negativita linie toxinu	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (79,3%)

### ANALYTICKÁ SENZITIVITA

Detekční hranici (cutoff) eseje pro toxin A byla stanovena koncentrace 0,63 ng/ml, pro toxin B koncentrace 0,16 ng/ml a pro enzym glutamát dehydrogenázu koncentrace 0,8 ng/ml.

### REPRODUCIBILITA

Reproducibilita testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* byla hodnocena použitím 12 vzorků stolice zabezpečených během testování kódy proti identifikaci. Testování probíhalo ve třech nezávislých laboratořích, po dobu tří dnů. U vzorků bylo dosaženo předpokládané 100% shody výsledků

Dále byla provedena další pětidenní studie probíhající na třech pracovištích, kdy byly testovány vzorky stolice o různém obsahu antigenu a toxinů. Celkem byly testovány tři skupiny o různém obsahu glutamát dehydrogenázy, toxinu A a toxinu B: vzorky s nízkou pozitivitou, středně silnou pozitivitou a vysokou negativitou. Všechny vzorky byly testovány na každém pracovišti různými pracovníky každý třikrát. Toto testování probíhalo dvakrát denně po pět dní. Získaná data z této pětidenní studie reproducibility jsou pro antigen i toxin uvedeny v Tabulce 6. U vzorku označeného jako Vzorek 1 bylo při detekci antigenu na jednom pracovišti méně než 90% negativních výsledků, kdežto na zbylých dvou pracovištích byly výsledky testování antigenu konzistentně negativní. U vzorku označeného jako Vzorek A bylo při detekci toxinu na jednom pracovišti méně než 90% pozitivních výsledků, kdežto na zbylých dvou pracovištích byly výsledky testování antigenu konzistentně pozitivní. Žádné z pracovišť nevykázalo jak pro detekci antigenu tak pro detekci toxinu výsledky pod hranicí očekávaných hodnot.

**Tabulka 6. Shrnutí výsledků pětidenní studie reproducibility**

Číslo vzorku	Antigen pozitivní	Antigen negativní	Toxin pozitivní	Toxin negativní
Vzorek 1 (95% předpoklad negativního výsledku)	15 (16,7%)	75 (83,3%)	0 (0%)	90 (100%)
Vzorek A (95% předpoklad pozitivního výsledku)	89 (98,9%)	1 (1,1%)	65 (72,2%)	25 (27,8%)
Vzorek B (mírně pozitivní)	87 (96,7%)	3 (3,3%)	86 (95,5%)	4 (4,5%)

**ZKŘÍŽENÁ REAKTIVITA**

Vzorky stolice obsahující inokulované organismy o koncentraci přibližně  $10^8$  či více organismů na ml nevykazovaly zkříženou reaktivitu v obou detekčních oblastech testovací kazety (pro antigen a toxin) testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™*.

**Bakteriální patogeny:** *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* (netoxigenní), *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157: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*

Jediným organismem jiným než je *C. difficile* vykazujícím reaktivitu v detekční oblasti pro toxiny byl kmen *Clostridium sordellii* VPI 9048. Tento kmen produkuje velké množství HT a LT toxinů, které jsou homologní s toxiny A a B *C. difficile*.

Následně uvedené viry v množství od  $10^{3,3}$  do  $10^{8,25}$  TCID jednotek v 0.2 ml nevykazovaly zkříženou reaktivitu v obou detekčních oblastech testovací kazety (pro antigen a toxin) testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™*:

**Viry:** Adenovirus typy 1, 2, 3, 5, 40, 41, lidský coronavirus, Coxsackievirus B2, B3, B4, B5, Echovirus 9, 11, 18, 22, 33, Enterovirus typy 68, 69, 70, 71, Rotavirus.

**INTERFERUJÍCÍ SUBSTANCE**

Následně uvedené substance obsažené v daných koncentracích ve stolici nijak neovlivnily získané výsledky testu:

mucin (3.5% w/v), lidská krev (40% v/v), barium sulfát (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), kyselina stearová/palmitová (40% w/v), metronidazol (0.25% w/v), vankomycin (0.25% w/v).

**VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ KLINICKÝCH IZOLÁTŮ ZÍSKANÝCH KULTIVACÍ NA CYKLOSERIN-CEFOXITIN-FRUKTÓZOVÉM AGARU (CCFA)**

Testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* byl testován celkový počet 103 klinických izolátů bakterie *C. difficile* získaných po třídenní anaerobní kultivaci na půdě CCFA při

teplotě 37°C. Testování bylo provedeno ze suspenze samosta tně narostlých kolonií přenesených do *diluentu* určeného pro vzorky stolice. Všechny 103 izolátů vykazovalo pozitivní výsledek detekce antigenu testem.

Z počtu 103 izolátů pocházelo 70 (68%) ze vzorků stolice, jež měly pozitivní výsledek detekce toxinu *C. difficile* při eseji na tkáňové kultuře. Z těchto 70 pozitivních izolátů mělo 56 (80%) pozitivní detekci toxinu při testování po 3 dnech anaerobní kultivace při 37°C na p ůdě.

#### LITERATURA:

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.

**Vyvinuto a vyrobeno firmou:**



**Blacksburg, VA 24060**



**Distributor:**



***2 Research Way  
Princeton, NJ 08540 USA***

TEL 1-877-441-7440

1-321-441-7200 OUTSIDE USA

***C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*** a **TECHLAB** jsou obchodními známkami firmy **TECHLAB<sup>®</sup>, Inc.**

**Vyrobeno v USA.**

**© 2009 TECHLAB<sup>®</sup>, Inc. Všechna práva rezervována.**

**RMS #91-T525C-01**

**Vydáno: 04/2009**