

VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B (CDAB)

IVD

Zastosowanie

VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B (CDAB) jest zautomatyzowanym testem przeznaczonym do stosowania w aparatach z rodziny VIDAS® do jakościowego wykrywania toksyny A i toksyny B *Clostridium difficile* w próbkach kału z wykorzystaniem metody ELFA (metoda enzymoimmunofluorescencyjna). Test VIDAS® *C. difficile* toxin A & toxin B (CDAB) jest pomocny w diagnozowaniu choroby wywołanej przez *Clostridium difficile* (CDAD).

Wprowadzenie

Naturalna flora bakteryjna jelit stanowi ekologiczną barierę, chroniącą przed znaczącą kolonizacją przez organizmy patogenne; naruszenie tej ochrony przez przyjmowanie antybiotyków może spowodować nadmierny rozwój endogennych lub przedostających się do organizmu w wyniku zakażenia szpitalnego patogenów, takich jak *Clostridium difficile*.

Bakterię *C. difficile* uznano za ważny czynnik etiologiczny poantybiotykowego rzekomobłoniastego zapalenia okrężnicy (PMC). PMC jest klinicznie zdefiniowanym zespołem, związanym z niedawnym stosowaniem antybiotyków. Polega na tworzeniu rzekomobłoniastych guzków lub płytek w okrężnicy dystalnej i esowatej oraz odbytnicy.^{1,2,3} Nierozpoznana lub nieleczone choroba może być śmiertelna. Bakteria *C. difficile* jest też przyczyną poantybiotykowego zapalenia okrężnicy (AAC) i biegunki poantybiotykowej (AAD).⁴

Zakażenia szpitalne *C. difficile* są poważnym problemem w przypadku niektórych placówek, szczególnie tych z dużą liczbą pacjentów szpitalnych, oddziałów chemioterapii lub długoterminowej opieki nad pacjentami.^{5,6,7} Wykazano również, że niemowlęta i pacjenci z mukowiscydozą (Cf) są bezobjawowymi nosicielami toksynogennych szczepów *C. difficile*, z częstością kolonizacji sięgającą 50% u niemowląt i 32% u pacjentów z mukowiscydozą.^{8,9}

Diagnoza kliniczna choroby związanej z zakażeniem *C. difficile* (CDAD) opiera się na zestawie kryteriów, w tym zazwyczaj: co najmniej 6 luźnych stolców w okresie 36 godzin, leczenie antybiotykowe w ciągu 8 tygodni poprzedzających biegunkę, brak innych oczywistych powodów biegunki oraz odpowiednia odpowiedź na leczenie.¹⁰

Szczepy *C. difficile* mogą być toksykogenne lub nietoksykogenne. Toksykogenne szczepy *C. difficile* wytwarzają enterotoksynę (toksynę A), a także cytotoksynę (toksynę B) w mniej więcej równych ilościach.^{2,11}

Jednak niektóre szczepy (serogrupa F) wytwarzają toksynę B, ale nie wytwarzają toksyny A.¹² Możliwe, że szczepy te są niedodiagnostowane ze względu na powszechne stosowanie metod diagnostycznych wykrywających tylko toksynę A.^{2,11}

Test VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B należy stosować jako pomoc w diagnozowaniu chorób związanych z zakażeniem *Clostridium difficile*. Umożliwia wykrycie toksyny A i toksyny B *C. difficile* w próbkach kału.¹³

Zasada działania

Podstawą oznaczenia jest połączenie dwustopniowego enzymatycznego testu immunologicznego typu sandwich z końcowym odczytem fluorescencji (ELFA).

Nośnik fazy stałej (pipetka SPR) jest przeznaczona do jednokrotnego użytku i służy jako nośnik fazy stałej oraz jako urządzenie pipetujące. Odczynniki potrzebne do wykonania badania są gotowe do użycia i umieszczone w szczelnie zamkniętych paskach testowych jednorazowego użytku.

Wszystkie etapy oznaczania są wykonywane automatycznie przez aparat. Medium reakcyjne jest cyklicznie podciągane i wypuszczane przez pipetkę SPR kilka razy. Po każdym etapie następuje cykl płukania eliminujący niezwiązane składniki:

- Specyficzne wiązanie toksyny A i / lub B obecnej w próbce z przeciwciałami przeciw toksynie A (królicze poliklonalne) i przeciwciałami przeciw toksynie B (mysie monoklonalne) pokrywającymi wewnętrzną ściankę pipetki SPR.
- Wiązanie pomiędzy toksyną A i przeciwciałami przeciwko toksynie A (mysimi) skoniugowane z biotyną oraz wiązanie pomiędzy toksyną B i przeciwciałami przeciw toksynie B (mysimi) skoniugowane z biotyną.
- Obecność biotyny jest wykrywana przez inkubację ze streptawidyną sprzężoną z alkaliczną fosfatazą.

- Detekcja: alkaliczna fosfataza katalizuje hydrolizę substratu (fosforan 4-metyloumbeliferylu) do produktu fluorescencyjnego (4-metyloumbeliferon), którego fluorescencję mierzy się przy długości fali 450 nm.

Intensywność fluorescencji zwiększa się wraz z ilością toksyny A lub B w próbce.

Po zakończeniu testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B wyniki są analizowane automatycznie przez aparat, generowana jest wartość testowa, a następnie dla każdej próbki drukowany jest wynik.

Zawartość zestawu (60 testów)

60 pasków CDAB ^(a)	STR	Gotowe do użycia.
60 pipetek SPR CDAB 2 x 30	SPR	Gotowe do użycia. Królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko toksynie A <i>C. difficile</i> i mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko toksynie B.
Standard CDAB ^(b) 1 x 4 ml (płynna)	S1	Roztwór rekombinowanej toksyny A pochodzącej z <i>C. difficile</i> w buforowanej soli fizjologicznej TRIS o stężeniu 0,05 mol/l (pH 7,2) + 5% BSA + środki konserwujące.
Kontrola dodatnia CDAB toksyny A ^(b) 1 x 4 ml (płynna)	C1	Roztwór rekombinowanej toksyny A pochodzącej z <i>C. difficile</i> w buforowanej soli fizjologicznej TRIS o stężeniu 0,05 mol/l (pH 7,2) + 5% BSA + środki konserwujące. Dane MLE wskazują zakres wartości Test Value (TV): Control C1 (+) Test Value Range.
Kontrola ujemna CDAB ^(b) 1 x 4 ml (płynna)	C2	Sól fizjologiczna buforowana TRIS 0,05 mol/l (pH 7,2) + 5% BSA + środki konserwujące. Dane MLE wskazują zakres wartości Test Value (TV): Control C2 (-) Test Value Range.
Kontrola dodatnia CDAB toksyny B ^(b) 1 x 4 ml (płynna)	C3	Roztwór rekombinowanej toksyny B pochodzącej z bakterii <i>C. difficile</i> w buforowanej soli fizjologicznej TRIS o stężeniu 0,05 mol/l (pH 7,2) + BSA 5% + środki konserwujące. Dane MLE wskazują zakres wartości Test Value (TV): Control C3 (+) Test Value Range.
Rozcieńczalnik 1 x 61 ml (płynna)	R1	Gotowe do użycia. Bufor TRIS o stężeniu 0,05 mol/l (pH 7,2) + płodowa surowica cielęca 50% + detergent + środki konserwujące.
Parametry fabrycznych danych wzorcowych wymaganych do skalibrowania oznaczenia: Kod kreskowy MLE (Master Lot Entry) wydrukowany na etykiecie pudełka.		
1 ulotka techniczna do pobrania na stronie: www.biomerieux.com/techlib		

(a) **NIEBEZPIECZEŃSTWO**



UWAGA



EUH208 / H317 / H318 / P261 / P280 / P302 + P352 / P305

+ P351 + P338



(b) **UWAGA**

EUH208 / H317 / P261 / P280 / P302 + P352

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia

- H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry.
- EUH208: Zawiera 2-metylo-2H-izotiazolin-3-one. Może powodować reakcję alergiczną.
- H318: Powoduje poważne urazy oczu.

Zwroty wskazujące środki ostrożności

- P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

- P305 + P351 + P338: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Kontynuować płukanie.
- P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
- P302 + P352: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ NA SKÓRĘ: Umyć dużą ilością wody z mydłem.

Więcej informacji zawiera karta charakterystyki substancji niebezpiecznej.

Pipetka SPR

Wnętrze pipetki SPR powlekane jest podczas produkcji przeciwciałami przeciwko toksynie A i toksynie B *C. difficile*. Każda pipetka SPR jest oznaczona kodem CDAB.

Z torebki należy wyjmować tylko potrzebną liczbę pipetek SPR, a potem ją dokładnie zamknąć.

Pasek testowy

Pasek składa się z 10 studzienek zakrytych folią opatrzoną etykietą. Etykieta naklejona na folii zawiera kod kreskowy, który określa typ wykonywanego oznaczenia, numer serii i datę ważności testu. Dla ułatwienia wprowadzenia próbki folia zakrywająca pierwszą studzienkę jest perforowana. W każdym pasku ostatnia studzienka jest kuwetą pomiarową, w której mierzona jest fluorescencja. Studzienki w centralnej części paska zawierają odczynniki potrzebne do wykonania badania.

Opis paska CDAB

Pasek zawiera dietanoloaminę i azydek sodu. Patrz powyższe zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia „H” oraz zwroty wskazujące środki ostrożności „P”.^(a)

Studzienki	Odczynniki
1	Studzienka na próbkę.
2 - 3 - 4	Roztwór płuczący: Buforowana sól fizjologiczna TRIS o stężeniu 0,05 mol/l (pH 7,2) + detergent + środki konserwujące (600 µl).
5	Koniugat: Rozcieńczzone mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko toksynie A <i>C. difficile</i> skoniugowane z biotyną i mysim przeciwciałem monoklonalnym przeciwko toksynie B <i>C. difficile</i> w połączeniu z biotyną + środki konserwujące (400 µl).
6	Znacznik: Streptawidyna znakowana fosfatazą alkaliczną + buforowana sól fizjologiczna TRIS 0,05 mol/l (pH 6,0) + środki konserwujące (400 µl).
7 - 8 - 9	Roztwór płuczący: Sól fizjologiczna buforowana TRIS o stężeniu 0,05 mol/l (pH 7,2) + detergent + środki konserwujące (600 µl).
10	Kuweta pomiarowa z substratem: fosforan 4-metyloumbeliferylu (0,6 mmol/l) + dietanoloamina (DEA) (0,62 mol/l lub 6,6% pH 9,2) + 1 g/l azydku sodu (300 µl).

Wyposażenie oraz materiały jednorazowe wymagane, lecz niewchodzące w skład zestawu.

- Pipeta z jednorazową końcówką do odmierzania objętości 300, 200 i 1000 µl.
- Rękawiczki jednorazowe bez talku.
- Wirówka osiągająca przyspieszenie $\geq 12\,000\text{ g}$.
- Probówki polipropylenowe lub inne odpowiednie do rozcieńczania i odwirowywania próbek (o pojemności co najmniej 1,5 ml)
- Pipetki do przenoszenia próbek, wykorzystywane do odmierzania odpowiedniej ilości próbki kału, który ma być poddany obróbce.
- Patyczki lub ezy do aplikacji próbki.
- Informacje o innych wymaganych materiałach znajdują się w Instrukcji obsługi aparatu.
- Aparaty z rodziny VIDAS®.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Wyłącznie do zastosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Wyłącznie do zastosowania profesjonalnego.

- Produkt zawiera materiały pochodzenia zwierzęcego. Świadczenie pochodzenia i/lub stanu sanitarnego zwierząt nie gwarantuje w pełni nieobecności czynników chorobotwórczych. Dlatego z produktem należy obchodzić się zgodnie z zasadami postępowania z materiałem potencjalnie zakaźnym (nie spożywać i nie wdychać).
- Zestaw odczynników zawiera azydek sodu, który może reagować z ołowiem lub miedzią, prowadząc do tworzenia wybuchowych azydków metali. Jeżeli jakiegokolwiek roztwór zawierający azydek sodu jest usuwany do kanalizacji, odpływy powinny zostać przepłukane wodą w celu uniknięcia niekorzystnego wpływu na armaturę.
- Nie używać odczynników po upływie terminu ważności, który jest podany na etykiecie opakowania.
- Nie mieszać odczynników (ani materiałów jednorazowych) z różnych serii.
- Nie używać pipetek SPR, jeśli torebka jest przedziurawiona lub jeśli odkleiła się folia zamykająca pipetkę SPR.
- Nie używać wizualnie uszkodzonych pasków testowych (zniszczona folia lub plastik).
- Używać rękawiczek bez talku, ponieważ talk może wpływać na poprawność wyników w przypadku pewnych oznaczeń immunoenzymatycznych.¹⁴
- Do przenoszenia Standardu oraz dodatków i ujemnej kontroli używać skalibrowanych pipet.
- Rozcieńczalnik próbki inny niż ten zawarty w opakowaniu testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B nie powinien być używany do testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.
- Patrz powyższe zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia „H” oraz zwroty wskazujące środki ostrożności „P”.
- Zabrudzenia aparatu powinny być dokładnie wycierane przy użyciu detergentu w płynie lub roztworu wybielacza używanego w gospodarstwach domowych, zawierającego przynajmniej 0,5% podchlorynu sodu. Patrz Instrukcja obsługi aparatu, sekcja opisująca czyszczenie plam na i w aparacie. Nie wolno sterylizować w autoklawie roztworów zawierających wybielacz.
- Aparat wymaga regularnego czyszczenia i odkażania (instrukcje dotyczące działań zapobiegawczych i konserwacyjnych zawiera Instrukcja obsługi aparatu).

Warunki przechowywania

- Przechowywać zestaw w +2°C/+8°C.
- **Nie zamrażać odczynników.**
- **Wszystkie nieużyte odczynniki należy przechowywać w temperaturze +2°C/+8°C.**
- Po otwarciu zestawu należy sprawdzić, czy torebka SPR jest prawidłowo zapieczętowana i nieuszkodzona. Jeżeli tak nie jest, nie należy używać takich pipetek SPR.
- **W celu zachowania stabilności pozostałych pipetek SPR należy po użyciu dokładnie zamknąć torebkę z osuszaczem w środku i ponownie umieścić cały zestaw w temperaturze +2°C/+8°C.**
- Przechowywanie w zalecanych warunkach gwarantuje stabilność wszystkich składników do terminu ważności podanego na etykiecie opakowania.

Próbki

Rodzaj, sposób pobrania i przechowywanie próbek

Próbki kału należy pobierać zgodnie ze standardowymi procedurami laboratoryjnymi i przechowywać w temperaturze +2°C/+8°C do czasu badania.

Próbki należy przesłać do laboratorium tak szybko, jak jest to możliwe po ich pobraniu.

Próbki kału można przechowywać do 3 dni (od momentu pobrania) w temperaturze +2°C/+8°C przed obróbką bez dużych strat wykrywalności *C. difficile* Toxin A & B. Przechowywanie dłużej w temperaturze +2°C/+8°C nie jest zalecane. Próbkę można przechowywać zamrożoną w temperaturze -31°C/-19°C przez jeden miesiąc, a następnie miesiąc po upływie tego czasu w temperaturze -70°C (lub niższej).

Unikać cykli zamrażania/rozmarzania.

Wymaz z odbytu nie zapewnia wystarczającej ilości kału i dlatego nie został zatwierdzony jako próbka do badań. Nie należy używać pojemników mogących zawierać detergenty, środki konserwujące lub podłoże, gdyż mogą one wpływać na wyniki testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.

Przygotowanie Standardu, kontroli i próbek do testu CDAB

Materiał do badań

Ważne: Bardzo ważne jest, by próbki zostały dokładnie wymieszane przed rozpoczęciem oznaczania. Jeśli próbka kału będzie niejednorodna, to można uzyskać błędne wyniki. Dokładne wymieszanie próbki kału pozwala uniknąć tego problemu. Rozcieńczona próbka musi być jednorodna po wymieszaniu. Zapewni to uzyskanie ważnych wyników.

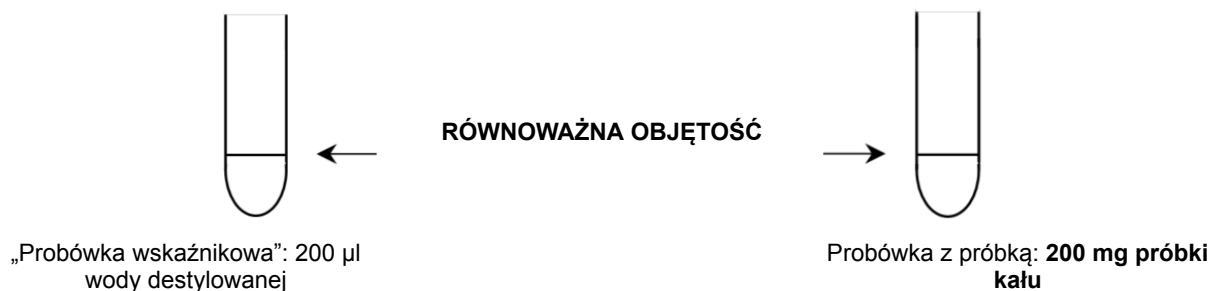
Kały płynne:

1. Wymieszać próbkę kału poprzez wciąganie do i wypuszczanie z pipetki. Używając tej samej pipety transferowej, przenieść 200 µl płynnego kału do czystej probówki wirówkowej.
2. Za pomocą pipety z jednorazową końcówką dodać 1000 µl rozcieńczalnika do próbek (R1) do probówki wirówkowej.
3. Ponownie wymieszać próbkę kału, zasysając ją do pipety transferowej i wypuszczając. Następnie mieszać w wytrząsarce aż do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Bardzo ważne jest, aby wszystkie porcje próbki były równomiernie wymieszane z rozcieńczalnikiem próbki (R1).
4. Wirować przez 5 minut w temperaturze +2°C/+25°C z przyspieszeniem wynoszącym co najmniej 12 000 g.
5. Używając pipety z jednorazową końcówką, pobrać 300 µl supernatantu, do wykonania testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.

Uwaga: Jeśli po odwirowaniu na powierzchni supernatantu pozostają cząstki stałe lub lipidy, należy pobrać próbkę poniżej warstwy powierzchniowej.

Kał półpłynny lub stały:

1. W celu zapewnienia precyzyjnego przeniesienia 200 mg kału w postaci półpłynnej lub stałej, należy najpierw dodać 200 µL wody destylowanej do czystej probówki do wirowania. Probówka ta będzie wykorzystywana jako „probówka wskaźnikowa”
2. **Energicznie wymieszać** próbkę kału za pomocą drewnianego aplikatora (szpatułki).
3. Przy pomocy drewnianego aplikatora przenieść próbkę kału (200mg) odpowiadającą objętości wody w probówce wskaźnikowej do nowej, czystej probówki wirówkowej oznaczonej jako probówka próbki (patrz poniżej) Umieścić próbkę kału na dnie probówki wirówkowej w taki sposób, aby ilość kału odpowiadała objętości wody w probówce wskaźnikowej(200 µl).



Uwaga: Po przeniesieniu wszystkich próbek kału w postaci półpłynnej lub stałej można wyrzucić probówkę wskaźnikową.

4. Dodać 1000 µl rozcieńczalnika (R1) do probówki z próbką za pomocą pipety z jednorazową końcówką.
5. Zemułgować próbkę kału za pomocą patyczka do aplikacji, następnie używając mieszadła typu vortex mieszać próbkę do momentu, aż będzie jednorodna. Bardzo ważne jest, aby wszystkie elementy próbki były dokładnie wymieszane z rozcieńczalnikiem (R1).
6. Wirować przez 5 minut w temperaturze +2°C/+25°C z przyspieszeniem wynoszącym co najmniej 12 000 g.
7. Używając pipety z jednorazową końcówką, pobrać 300 µl supernatantu, do wykonania testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.

Uwaga:

- Jeśli po odwirowaniu na powierzchni supernatantu pozostają cząstki stałe lub lipidy, należy pobrać próbkę poniżej warstwy powierzchniowej.
- W sytuacjach gdy kał półpłynny zawiera więcej płynu niż ciała stałego, procedurę przygotowania próbki można przeprowadzić zgodnie z instrukcjami dotyczącymi kałów płynnych (patrz część „Próbki: Kały płynne”).

Standard i kontrole

Standard i kontrole dodatnie oraz ujemne należy przygotować tak jak próbki pacjenta.

1. Energicznie wymieszać za pomocą mieszadła typu vortex.
2. Pobrać 200 µl standardu i kontroli za pomocą pipety z jednorazową końcówką i przenieść do czystej probówki.
3. Dodać 1000 µl rozcieńczalnika (R1) do probówki wirówkowej za pomocą pipety z jednorazową końcówką.
4. Wymieszać przy użyciu mieszadła typu vortex.
5. Używając pipety z jednorazową końcówką, pobrać 300 µl supernatantu, do wykonania testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.

Przechowywanie przygotowanych próbek

Przygotowane supernatanty próbek, standard i kontrole można przechowywać do 48 godzin w temperaturze +2°C/+8°C przed ich oznaczeniem przy pomocy testu VIDAS® CDAB.

Po 48 godzinach przygotowane: supernatanty, standard i kontrole należy wyrzucić.

Instrukcja użytkowania

Pełne informacje zawarte są w Instrukcji obsługi aparatu.

Odczytywanie danych VIDAS® PTC (Protocol Test Change) i danych MLE

Przed rozpoczęciem pracy z testem

Za pomocą zewnętrznego czytnika kodów kreskowych zeskanować kody kreskowe (PTC i MLE) w następującej kolejności:

1. W zależności od rodzaju używanego aparatu, zeskanować kod(-y) kreskowy(-e) PTC, który(-e) można pobrać ze strony www.biomerieux.com/techlib. Odczyt ten umożliwi systemowi VIDAS® przesłanie danych protokołu PTC do oprogramowania aparatu w celu aktualizacji.
2. Zeskanować kod MLE znajdujący się na etykiecie opakowania.

Uwaga: Jeśli kod MLE został odczytany przed wprowadzeniem danych protokołu VIDAS® PTC, należy ponownie odczytać kod MLE.

Przed rozpoczęciem pracy z nową serią testu

Przed wykonaniem badań za pomocą zewnętrznego czytnika kodów kreskowych zeskanować kod MLE znajdujący się na etykiecie opakowania.

Jeśli dane te nie zostaną wprowadzone **przed rozpoczęciem badania**, analizator nie będzie w stanie wydać wyników.

Uwaga: dane krzywej kalibracyjnej należy wprowadzić do pamięci aparatu tylko raz dla danej serii odczynników

Dane MLE można wprowadzać **ręcznie lub automatycznie**, w zależności od aparatu (patrz Instrukcja obsługi).

Kalibracja

Kalibrację przy użyciu wzorca dołączonego do zestawu należy wykonywać po otwarciu każdej nowej serii odczynników, po wprowadzeniu danych MLE, a później co 14 dni.

Dzięki tej operacji uzyskuje się krzywe kalibracyjne specyficzne dla danego urządzenia, operacja ta również kompensuje możliwe niewielkie odchylenia w sygnale oznaczenia aż do upływu daty ważności zestawu.

Wzorzec oznaczony jako S1 należy testować w dwóch powtórzeniach.

Wartość standardowa musi mieścić się w ustawionym zakresie RFV (względna wartość fluorescencji) wskazanym w danych MLE. Jeżeli tak nie jest, należy ponownie wykonać kalibrację.

Procedura:

1. Wyjąć z lodówki tylko potrzebne odczynniki.
2. Należy użyć jednego paska „CDAB” i jednej pipetki SPR „CDAB” dla każdej próbki, kontroli lub standardu, które będą badane. **Po wyjęciu odpowiedniej liczby pipetek SPR należy dokładnie zamknąć torebkę.**
3. Test oznaczony jest w aparacie kodem „CDAB”. Wzorzec oznaczony jako S1 należy testować w dwóch powtórzeniach. Jeżeli badane są kontrole dodatnie, powinny być oznaczone jako „C1” i „C3”. Jeśli badana jest kontrola ujemna, powinna być oznaczona kodem „C2”.
4. **Dla tego testu, objętość testowa przygotowanych: standardu, próbki lub kontroli wynosi 300 µL.**
5. Włożyć pipetki SPR „CDAB” i paski „CDAB” do analizatora. Sprawdzić, czy kolorowe nalepki z kodem testu na pipetkach SPR zgadzają się z analogicznymi umieszczonymi na paskach testowych.
6. Rozpocząć analizę zgodnie z Instrukcją obsługi. Wszystkie etapy oznaczenia są automatycznie wykonywane przez aparat.
7. Test zostanie wykonany w ciągu około 75 minut. Po zakończeniu badania usunąć pipetki SPR i paski odczynnikowe z urządzenia.
8. Zużyte pipetki SPR i paski odczynnikowe należy umieścić w odpowiednim pojemniku.

Wyniki i interpretacja

Odczyt fluorescencji w kuwecie pomiarowej każdego paska testowego jest wykonywany dwukrotnie. Pierwszy odczyt dotyczy tła kuwety z substratem, zanim do substratu zostanie wprowadzona pipetka SPR.

Drugi odczyt następuje po inkubacji substratu z enzymem związanym z wewnętrzną powierzchnią pipetki SPR.

Względna wartość fluorescencji (Relative Fluorescence Value, RFV) obliczana jest jako różnica wartości końcowej i tła. Obliczenie to pojawia się na końcowym wydruku.

Wartość testowa jest obliczana przez aparat dla każdej próbki w następujący sposób:

Wartość testowa = RFV próbki pacjenta / RFV standardu

Wartość testowa i jej interpretacja podane są również na wydruku końcowym. Interpretacja wyników według wartości testowej jest następująca:

Wartość testowa	Wynik
< 0,13	Ujemny
≥ 0,13 do < 0,37	Niejednoznaczny
≥ 0,37	Dodatni

W przypadku niejednoznacznych wyników, ze względu na niejednorodność rozkładu toksyn w niektórych próbkach, zaleca się powtórzenie testu z użyciem pierwotnej lub świeżej próbki. Próbkę należy pobrać w ciągu dwóch tygodni, biorąc pod uwagę objawy kliniczne i historię pacjenta. Jeśli wynik będzie nadal niejednoznaczny, próbkę należy zbadać inną metodą.

Wyniki niepoprawne uzyskiwane są, gdy pomiar tła paska z próbką przekracza wcześniej określoną wartość odcięcia. Wskazuje to na zanieczyszczenie substratu. Próbki, dla których uzyskano niepoprawne wyniki, należy oznaczyć ponownie wykorzystując wcześniej przygotowaną próbkę (jeśli jest to możliwe) lub próbkę świeżo pobraną.

Interpretacja wyniku testu powinna być prowadzona z uwzględnieniem historii choroby pacjenta i wyników innych badań.

Kontrola jakości

Każdy zestaw VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B zawiera dwie kontrole dodatnie i jedną ujemną. Kontrole te należy oznaczyć niezwłocznie po otwarciu nowego zestawu, aby upewnić się, że wydajność odczynników nie uległa zmianie. Każda kalibracja musi być także sprawdzona przy użyciu tych kontroli. Kontrole należy oznaczyć zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym laboratorium. Kontrole należy przygotować w ten sam sposób, co próbki pacjentów i dodać bezpośrednio do studzienek na próbki w paskach odczynników testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.

Aparat będzie w stanie sprawdzić poprawność kontroli tylko wtedy, jeśli zostaną one oznaczone jako C1, C2 i C3.

Wyniki nie mogą zostać zatwierdzone, jeżeli wartości prób kontrolnych nie zawierają się w oczekiwanych przedziałach zaznaczonych na etykietach fiolek.

Uwaga: Użytkownik jest zobowiązany do prowadzenia kontroli jakości zgodnie z obowiązującymi lokalnymi przepisami.

Ograniczenia metody

- Rozcieńczalnik inny niż R1 z zestawu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B nie powinien być używany do testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.
- Smółka może interferować z testem VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B – nie badać próbek od niemowląt w wieku poniżej dwóch lat.
- Próbki kału zawierające duże ilości tłuszczu mogą dawać błędne wyniki. Należy unikać oznaczania tego typu materiału przy pomocy testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.
- Ze względu na niejednorodność próbki niezwykle ważne jest dokładne wymieszanie kału, ponieważ pozwala to uniknąć uzyskania rozbieżnych wyników. W przypadku uzyskania wyników, które nie korelują z danymi klinicznymi, należy powtórzyć badanie używając świeżej próbki.
- Poziom toksyn może być inny w różnych próbkach pacjenta.
- Pojedynczy, ujemny wynik testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B nie wyklucza możliwości wystąpienia zapalenia okrężnicy ani biegunki związanych z zakażeniem bakterią *C. difficile*. Może on być skutkiem nieodpowiedniego sposobu pobrania, przechowywania lub postępowania z próbką. Podczas diagnozowania zakażenia *C. difficile* wyniki testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B należy zawsze oceniać w połączeniu z objawami klinicznymi i historią choroby pacjenta.
- Pojedynczy dodatni wynik testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B nie może stanowić jedynego kryterium rozpoznania zapalenia okrężnicy ani biegunki związanych z zakażeniem bakterią *C. difficile*. Podczas diagnozowania choroby związanej z zakażeniem *C. difficile* wyniki testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B należy zawsze oceniać w połączeniu z objawami klinicznymi i historią choroby pacjenta.

Dane epidemiologiczne

W badaniu przeprowadzonym w Europie przez ESGCD (European Study Group on *Clostridium difficile*, Europejska Grupa Badawcza ds. *Clostridium difficile*) średnia częstotliwość występowania dodatnich wyników oznaczania toksyn dla próbek kału pochodzących ze 136 szpitali wynosiła 9.5%.¹⁵

W Ameryce Północnej, na podstawie badania kanadyjskiego obejmującego 380 szpitali, średnie wskaźniki pozytywnego wyniku testu wahały się od 13,2% do 17,2% w zależności od wielkości szpitala (< 300 do > 500 łóżek), ze średnią częstością (choroby związane z *Clostridium difficile*) między 23,5 do 40,3 przypadków na 100 000 pacjento-dni.¹⁶ W dokumencie przedstawiającym stanowisko SHEA (Amerykańskie Towarzystwo Epidemiologiczne) odnotowano wskaźnik od 17 do 60 przypadków na 100 000 łóżko-dni.¹⁷

Wiarygodność

Precyzja

Badanie precyzji przeprowadzono w 3 ośrodkach przy użyciu 6 pul próbek: 2 ujemne, 1 niejednoznaczna, 3 dodatnie (nisko, średnio i wysoko).

Każda próbka była testowana w dwóch powtórzeniach w 2 cyklach dziennie na każdej 2 serii odczynników w każdym z 3 ośrodków. Każdą serię testowano w okresie 6 dni (N = 144 na próbkę).

Precyzja w obrębie testu (precyzja w ramach cyklu), precyzja między testami (między cyklami, między dniami, między seriami i między ośrodkami) oraz precyzja całkowita zostały obliczone w oparciu o zalecenia CLSI® EP5-A2.

Wyniki przedstawiono w poniższej tabeli:

Tabela 1: Precyzja testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B

Próbka	Średnie stężenie Wartość testowa	Precyzja w cyklu		Precyzja między cyklami		Precyzja całkowita	
		Odchylenie standardowe	CV (%)	Odchylenie standardowe	CV (%)	Odchylenie standardowe	CV (%)
Ujemna 1	0,018	0,0049	26,3	0,0050	26,8	0,0069	37,6
Ujemna 2	0,088	0,0060	6,8	0,0081	9,2	0,0101	11,5
Niejednoznaczny	0,197	0,0091	4,6	0,0169	8,6	0,0192	9,7
Słabo dodatnia	0,678	0,0256	3,8	0,0622	9,2	0,0673	9,9
Średnio dodatnia	1,340	0,0446	3,3	0,1105	8,2	0,1192	8,9
Wysoko dodatnia	2,914	0,0831	2,9	0,1987	6,8	0,2153	7,4

Reakcje krzyżowe i interferencje

Aby przetestować reaktywność krzyżową, każdy organizm rozcieńczono w kontroli ujemnej testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B, przygotowano jak próbkę pacjenta i oznaczono pojedynczo testem VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B. Aby zbadać interferencję, każdy organizm rozcieńczono w kontrolach dodatnich, przygotowano jak próbkę pacjenta i oznaczono pojedynczo testem VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B. Próbkami organizmów były testowane przy stężeniu 1,10⁷ CFU/ml (0,033 w skali McFarlanda) z wyjątkiem *C. sordelli*, która była testowana przy stężeniu 3,10⁸ CFU/ml (1 w skali McFarlanda).

W poniższej tabeli wymieniono organizmy, które zostały przetestowane i nie wykazały żadnej reaktywności krzyżowej ani interferencji z testem VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B.

<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>
<i>Shigella flexneri</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella sonnei</i>
<i>Salmonella group B (paratyphi B)</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7
<i>Escherichia coli</i>
<i>Candida albicans</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Campylobacter jejuni ssp jejuni</i>
<i>Campylobacter coli</i>
<i>Vibrio cholerae</i>

<i>Aeromonas hydrophila ssp hydrophila</i>
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Porphyromonas assacchrolyticus</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>
<i>Clostridium difficile</i> (nietoksykogeny) VPI 0210114
<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Clostridium subterminale</i>
<i>Clostridium sordelli*</i>
<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Clostridium tertium</i>
<i>Clostridium tetani</i>
<i>Clostridium septicum</i>
<i>Clostridium innocuum</i>
<i>Clostridium novyi</i>

* Reaktywność krzyżowa może być obserwowana w przypadku *C. sordelli* VPI9048, w zależności od warunków hodowli. Podczas badań klinicznych nie zaobserwowano interferencji z próbkami kału, które wydawały się zawierać dużą ilość śluzu lub krwi.

Test VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B był oceniany z wykorzystaniem różnych szczepów *C. difficile*. Szczepy hodowano w bulionie drożdżowo-peptonowym i testowano pod kątem reaktywności z testem VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B. Wyniki podsumowane poniżej wskazują, że test VIDAS® CDAB zidentyfikował toksynogenne szczepy *C. difficile*, nawet jeśli wytwarzały tylko toksynę B.

Warianty <i>C. difficile</i>	% pozytywnych wyników testu VIDAS® CDAB / całkowita liczba szczepów
A+/B+	100% (23/23)
A-/B+	83% (15/18*)

* Dla trzech (3) szczepów A-/B+ uzyskano wątpliwe wyniki testu VIDAS® CDAB.

Granica wykrywalności

Granice wykrywalności oceniano przy użyciu szeregu rozcieńczeń rekombinowanych toksyn A i B *C. difficile* w buforze TRIS z albuminą wołową.

Test VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B wykrywa toksynę A na poziomie ≥ 3 ng/ml i toksynę B na poziomie ≥ 1 ng/ml.

Ocena kliniczna

1011 świeżych próbek kału przebadano w dwóch ośrodkach klinicznych (w USA i Europie). Każda próbka została oznaczona przy użyciu testu VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B na aparacie VIDAS® i dostępnego na rynku manualnego testu EIA. Test cytotoxyczności komórkowej każdej próbki (złoty standard) scentralizowano i przeprowadzono w niezależnym trzecim ośrodku.

Test VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B został porównany z testem cytotoxyczności komórkowej i komercyjnym testem EIA.

Tabela 2: Test VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B w porównaniu z testem cytotoxyczności

	Ośrodek 1			Ośrodek 2			Wszystkie ośrodki		
	Test cytotoxyczności			Test cytotoxyczności			Test cytotoxyczności		
	Dodatni	Ujemny	Razem	Dodatni	Ujemny	Razem	Dodatni	Ujemny	Razem

		Ośrodek 1			Ośrodek 2			Wszystkie ośrodki		
		Test cytotoksyczności			Test cytotoksyczności			Test cytotoksyczności		
VIDAS®	Dodatni	68	2	70	38	0	38	106	2*	108
	Niejednoznaczny	6	20	26	6	10	16	12	30	42***
	Ujemny	9	518	527	5	329	334	14**	847	861
Razem		83	540	623	49	339	388	132	879	1011
Wiarygodność		Wartość (%)	95% przedział ufności		Wartość (%)	95% przedział ufności		Wartość (%)	95% przedział ufności	
Czułość		88,3	79,0–94,5		88,4	74,9–96,1		88,3	81,2–93,5	
Swoistość		99,6	98,6–99,9		100,0	98,9–100,0		99,8	99,2–99,9	
Pozytywna wartość predykcyjna (PPV)		97,1	90,1–99,7		100,0	90,7–100,0		98,1	93,5–99,8	
Negatywna wartość predykcyjna (NPV)		98,3	96,8–99,2		98,5	96,5–99,5		98,4	97,3–99,1	

* Dwie (2) próbki dały wyniki dodatnie w teście VIDAS® CDAB i ujemne w teście cytotoksyczności komórkowej i komercyjnym testem EIA.

** Czternaście (14) próbek dało wyniki ujemne w teście VIDAS® CDAB i dodatnie w teście cytotoksyczności komórkowej, z których 10 dało wyniki ujemne, a 4 dodatnie komercyjnym testem EIA.

*** 4,2% próbek było niejednoznacznych w teście VIDAS® CDAB i nie uwzględniono ich w obliczeniach czułości, swoistości, NPV i PPV.

Tabela 3: Test VIDAS® C. difficile Toxin A & B Assay w porównaniu z testem komercyjnym EIA

		Ośrodek 1			Ośrodek 2			Wszystkie ośrodki		
		Test komercyjny EIA			Test komercyjny EIA			Test komercyjny EIA		
		Dodatni	Ujemny	Razem	Dodatni	Ujemny	Razem	Dodatni	Ujemny	Razem
VIDAS®	Dodatni	67	3	70	37	1	38	104	4*	108
	Niejednoznaczny	7	19	26	2	14	16	9	33	42***
	Ujemny	18	509	527	6	328	334	24**	837	861
Razem		92	531	623	45	343	388	137	874	1011
Wiarygodność		Wartość (%)	95% przedział ufności		Wartość (%)	95% przedział ufności		Wartość (%)	95% przedział ufności	
Zgodność wyników dodatnich		78,8	68,6–86,9		86,0	72,1–94,7		81,3	73,4–87,6	
Zgodność wyników ujemnych		99,4	98,3–99,9		99,7	98,3–99,9		99,5	98,8–99,9	
Zgodność całościowo		96,5	94,7–97,8		98,1	96,2–99,2		97,1	95,9–98,1	

* Cztery (4) próbki dały wyniki pozytywne w teście VIDAS® CDAB i ujemne w komercyjnym teście EIA, z których 2 dały wyniki dodatnie, a 2 ujemne w teście cytotoksyczności komórkowej.

** Dwadzieścia cztery (24) próbki dały wyniki ujemne w teście VIDAS® CDAB i dodatnie w komercyjnym teście EIA, z których 20 dało wyniki ujemne, a 4 dodatnie w teście cytotoksyczności komórkowej.

*** 4,2% próbek okazało się niejednoznacznych w teście VIDAS® CDAB i nie zostało uwzględnionych w obliczeniach pozytywnej, negatywnej i ogólnej zgodności.

Utylizacja odpadów

Zużytych odczynników, jak i zanieczyszczonych sprzętów jednorazowych, należy pozbywać się zgodnie z procedurami dla materiałów zakaźnych lub potencjalnie zakaźnych.






Za obchodzenie się i składowanie wytworzonych odpadów oraz ścieków odpowiedzialne jest laboratorium, które musi traktować je i składować (lub powierzyć do składowania) stosownie do stopnia ich niebezpieczeństwa oraz zgodnie z odpowiednimi regulacjami prawnymi.





W krajach UE zaleca się spalenie całego materiału związanego z badaniem, w tym materiału używanego do czyszczenia wycieków, skażonych opakowań i / lub niewykorzystanych i przeterminowanych testów IVD.

Literatura

1. BARTLETT, J.G., *et al.* 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing *Clostridia*. *New England Journal of Medicine*. 298:531-534.
2. LYERLY, D., *et al.* 1988. *Clostridium difficile*: Its Diseases and Toxins. *Clin. Micro. Reviews*. 1:1-18.
3. BARBUT F., *et al.* 2001. Epidemiology of *Clostridium Difficile*-associated infections. *Clin. Microbiol. and Infect.*, 7 (8), 405 – 410.
4. GEORGE, W.L., *et al.* 1982. *Clostridium difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent associated diarrhea and miscellaneous conditions. *J. Clin. Micro.* 15:1049-1053.
5. CUDMORE, M.A., *et al.* 1982. *Clostridium difficile* colitis associated with cancer chemotherapy. *Arch. Intern. Med.* 142:333-335.
6. DELMEE, M.B., *et al.* 1987. Epidemiology and prevention of *Clostridium difficile* infections in a leukemia unit. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:623-627.
7. GERDING, D.N. 1989. Disease associated with *Clostridium difficile* infection. *Ann. Intern. Med.* 110:255-257
8. COOPERSTOCK, M. 1988. *Clostridium difficile* in infants and children. In Rolfe, R.D. and S.M. Finegold (eds.) *Clostridium difficile*: Its Role in Intestinal Disease. *Academic Press, Inc.* San Diego, CA. 45-64.
9. PEACH, S.L., *et al.* 1986. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Pathol.* 39:1013-1018.
10. PETERSON, L.R., *et al.* 1989. Laboratory methods for the diagnosis of *C. difficile*-related gastrointestinal disease. *Lab. Management*. 42-45.
11. BRAZIER J.S. *et al.* 2000. Microbiology, Epidemiology, and Diagnosis of *Clostridium Difficile* Infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 250, 1 – 33.
12. PITUCH H. *et al.*, 2001. Clonal dissemination of a toxin-A-negative / toxin-B-positive *Clostridium Difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. *Clin. Microbiol. and Infect.*, 7 (8), 442 – 446.
13. WILCOX M.H. and EASTWOOD K.A., Evaluation Report: *Clostridium difficile* toxin detection assays, CEP08054, NHS, February 2009, 36 p.
14. LAMPE, A.S., *et al.* 1988. Wearing gloves as cause of false negative HIV tests. *Lancet* ii 1140-1141.
15. BARBUT F, *et al.* 2003. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, vol 9: 989-996.
16. ALFA J, *et al.* 1998. Survey of incidence of *Clostridium difficile* in Canadian hospitals and diagnostic approaches. *JCM*; vol 26, n°7: 2076-2080.
17. SIMOR AE *et al.* 2002. *Clostridium difficile* in long-term-care facilities for elderly. *Infection Control and Hospital Epidemiology*; vol 23, n°11: 696-703.

Tabela symboli

Symbol	Znaczenie
	Numer katalogowy
	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>In Vitro</i>
	Wytwórca
	Przestrzegać zakresu temperatury
	Użyć przed

Symbol	Znaczenie
	Kod partii
	Sprawdź w instrukcji użycia.
	Wystarczy na wykonanie <n> testów
	Data produkcji

Ograniczona gwarancja

Firma bioMérieux gwarantuje poprawne działanie produktu zgodnie z jego wskazanym zastosowaniem, pod warunkiem ścisłego przestrzegania wszelkich procedur użycia, przechowywania i obsługi, czasu przydatności do użycia (jeśli dotyczy) oraz środków ostrożności opisanych w instrukcji użycia (IFU).

Z wyjątkiem wyraźnie określonej gwarancji, wskazanej powyżej, firma bioMérieux niniejszym wyłącza wszelkie gwarancje, w tym wszelkie domniemane gwarancje przydatności handlowej i przydatności do określonego celu lub zastosowania, oraz wyłącza wszelką odpowiedzialność, bezpośrednią, pośrednią lub wynikową, za jakiegokolwiek użycie odczynnika, oprogramowania, urządzenia i materiałów eksploatacyjnych („System”) w sposób inny niż wskazano w instrukcji użycia (IFU).

Historia zmian

Kategorie typów zmian

nd.	Nie dotyczy (pierwsze wydanie)
Poprawka	Poprawka nieprawidłowości w dokumentacji
Zmiana techniczna	Uzupełnienie, korekta i/lub usunięcie informacji dotyczących produktu
Zmiana administracyjna	Wdrożenie zmian innych niż techniczne, istotnych dla użytkownika

Uwaga: Historia zmian nie zawiera drobnych zmian graficznych, gramatycznych oraz dotyczących formatowania.

Data wydania	Numer partii	Typ zmiany	Podsumowanie zmiany
2018/05	11733J	Administracyjna	Ograniczona gwarancja
2019-07	051091-02	Zmiana techniczna	Zawartość zestawu (60 testów) Ostrzeżenia i środki ostrożności
2020-11	051091-03	Administracyjna	Zmiany formatu i sposobu zapisu treści.
		Zmiana techniczna	Utylizacja odpadów

BIOMERIEUX, logo BIOMERIEUX, SPR oraz VIDAS są znakami towarowymi używanymi, w trakcie rejestracji i/lub zastrzeżonymi, należącymi do bioMérieux, jednego z jego podmiotów zależnych lub jednej z jego firm.

CLSI jest znakiem towarowym należącym do Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc.

Jakiegokolwiek inne nazwy i znaki handlowe należą do odpowiednich właścicieli.

REACH: nr autoryzacji — w oczekiwaniu na decyzję Unii Europejskiej.

Informacje dla użytkowników znajdujących się w Unii Europejskiej (norma (EU) 2017/746) i w krajach, w których obowiązują podobne wymogi: W przypadku wystąpienia poważnego incydentu podczas stosowania niniejszego wyrobu lub na skutek jego użytkowania należy zgłosić tego rodzaju zdarzenie producentowi i/lub jego autoryzowanemu przedstawicielowi, a także lokalnym władzom.

