

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИНОВ А+В *Clostridium difficile* В ОБРАЗЦАХ КАЛА И СУСПЕНЗИЯХ КУЛЬТУР

E-040, Clostridium difficile Toxin A+B

Каталог. № : E-040
Количество : 96
Производитель: Serazym
Diagnostica GmbH, (Германия)

Методика от 01-06-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Clostridium difficile это бактерия, вызывающая госпитальную диарею у взрослых во время или после лечения антибиотиками, например такими, как цефалоспорины третьего поколения (1). Хотя 2-3% здоровых людей и 20-50% здоровых детей являются носителями *Clostridium difficile*, обычно инфекция имеет экзогенное происхождение, инфицирование происходит при контакте либо с персоналом больниц, либо со спорами *Clostridium difficile* в туалетах, постельном белье и т.д. Оба экзотоксина А и В этой спорообразующей бактерии вызывают деполимеризацию актиновых филаментов из-за внутриклеточной энзиматической модификации rho-белков. Вследствие этого проницаемость клеточной мембраны возрастает, что способствует проникновению нейтрофилов. Это приводит к появлению клинической картины так называемой *Clostridium difficile* -ассоциированной диареи и колита, или, в итоге, к псевдомембранозному колиту (PMC) (1). Так как продукция токсинов и начало заболевания коррелируют, диагностика инфекции *Clostridium difficile* в основном основана на прямом выявлении токсинов в образцах кала. До настоящего времени цитотоксический тест считался «золотым стандартом» для выявления токсинов *Clostridium difficile*. Недавно он был в большой степени заменен иммунологическими тестами, как например иммуоферментный анализ (2).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Serazym® *Clostridium difficile* Toxin A+B ELISA предназначен для прямого определения токсинов А+В *Clostridium difficile* в образцах кала и суспензиях культур с целью диагностики *in vitro*.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор Serazym® *Clostridium difficile* Toxin A+B основан на непрямом иммуоферментном анализе с использованием поликлональных и моноклональных антител для качественного определения токсинов А и В *Clostridium difficile*.

Токсины А и В *Clostridium difficile*, присутствующие в образцах и положительном контроле, взаимодействуют с антителами к токсинам А и В, сорбированными в лунках микропланшета. После инкубации при промывке из лунок удаляются несвязавшиеся компоненты.

Затем во время второй инкубации связавшиеся токсины специфически взаимодействуют с биотинилированными поликлональными антителами к токсинам А и В. Не связавшиеся компоненты отделяются от связанного с лунками образовавшегося иммунного комплекса при промывке. При третьей инкубации конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат) реагирует со связавшимися биотинилированными антителами. Не связавшийся конъюгат удаляется при промывке. Затем в лунки добавляется бесцветный раствор субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), который под действием HRP окрашивается в голубой цвет. Энзиматическая реакция останавливается добавлением фосфорной кислоты, при этом окрашивание раствора в лунках меняется с голубого на желтое.

Оптическая плотность (ОП) раствора, считанная при длине волны 450/620 нм, прямо пропорциональна количеству специфически связанных токсинов А и В *Clostridium difficile*. Учитывая значение «cut-off», результаты интерпретируются как положительные или отрицательные.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Компонент набора (96 лунок)	Количество
1. Микропланшет «WELLS» 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипа (всего 96 лунок), покрытых мышиными моноклональными антителами к токсинам А и В.	1 планшет в вакуумной упаковке с осушителем
2. Буфер для промывок, «WASHBUF 10X» концентрат 10x, для приготовления 1000 мл раствора	100 мл Концентрат Белая крышка
3. Буфер для разведения образцов, «DIL»	100 мл Готов к использованию Желтого цвета Черная крышка
4. Положительный контроль Реактивный образец токсинов <i>C. difficile</i>	2.0 мл Готов к использованию Синего цвета Красная крышка
5. Отрицательный контроль Образец негативный по токсинам <i>C. difficile</i>	2.0 мл Готов к использованию Синего цвета Зеленая крышка
6/1. Биотиновый конъюгат «CONJ BIOTIN» Биотинилированные кроличьи поликлональные антитела к токсинам А и В	15 мл Готов к использованию Зеленого цвета Белая крышка
6/2. Конъюгат стрептавидин-HRP «CONJ STREPT»	15 мл Готов к использованию Красного цвета Коричневая крышка
7. Раствор субстрата «SUBSTR TMB» 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и перекись водорода	15 мл Готов к использованию Синяя крышка
8. Стоп-раствор «STOP» 0.25 М фосфорная кислота	15 мл Готов к использованию Желтая крышка

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Определение токсинов в образцах кала

Сбор и хранение

Образцы кала должны храниться при 2-8 °С сразу же после сбора и обрабатываться в течение 72 часов. Избегайте хранения при -20 °С, так же, как и повторных циклов замораживания-оттаивания.

Образцы, содержащие формалин в качестве консерванта не могут быть использованы для тестирования данным методом.

Образцы кала, уже разведенные с помощью разбавителя образцов, могут храниться через ночь при 2-8°С и тестироваться на следующий день.

Подготовка

Нагрейте образцы до комнатной температуры и тщательно перемешайте.

Внесите по 1000 мкл буфера для разведения образцов в чистые пробирки. Используя одноразовые стеклянные палочки, перенесите примерно 200 мг (диаметр примерно 4-6 мм) образцов кала (если они твердые) или пипетируйте по 200 мкл (если жидкие) в пробирки и тщательно ресуспендируйте. Если необходимо, осадите плавающие частицы центрифугированием в микроцентрифуге на максимальной скорости 1 мин.

Определение токсинов в суспензиях культур (токсигенная культура)

В данном тесте можно напрямую исследовать колонии *Clostridium difficile*, выросшие на кровяном или селективном агаре (напр. ССФА) в анаэробных условиях 48 часов:

Внесите по 1000 мкл буфера для разведения образцов в чистые пробирки. Перенесите по 2-4 инокуляционные петли культуры *Clostridium difficile* в пробирку с буфером и тщательно ресуспендируйте на вортексе. Для процедуры анализа используйте 100 мкл.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

- ✓ микропипетки
- ✓ многоканальные пипетки
- ✓ контейнер для реагентов для многоканальных пипеток
- ✓ 8-канальная гребенка с вакуумным насосом и бутылка для отходов или микропланшетный вошер
- ✓ микропланшетный ридер для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм или более
- ✓ дистиллированная или деионизированная вода
- ✓ стеклянная лабораторная посуда
- ✓ пробирки (2 мл) для приготовления образцов
- ✓ орбитальный шейкер для варианта 2 постановки

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Количество тестов и срок годности

Один набор предназначен для проведения 96 определений. Срок годности каждого компонента указан на этикетке соответствующего флакона, а всего набора - на внешней этикетке упаковки набора. После получения все компоненты набора должны храниться при 2-8 °С, желательнее в оригинальной упаковке набора. После вскрытия все компоненты набора стабильны не менее 2 месяцев, при условии правильного хранения. Приготовленный для использования промывочный раствор стабилен как минимум 1 месяц при 2- 8 °С.

Подготовка реагентов

Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры.

Микропланшет хранится в запечатанном пакете из фольги, с осушителем. Планшет состоит из рамки и «ломаемых» стрипов. Пакет с планшетом должен достичь комнатной температуры перед вскрытием. Неиспользованные лунки должны храниться в холодном месте и защищенными от влаги, в оригинальной тщательно запечатанной упаковке.

Приготовьте достаточное количество буфера для промывки: разведите концентрат буфера для промывки в 10 раз (1+9) дистиллированной или деионизированной водой.

Например: 10 мл концентрата буфера для промывки + 90 мл дистиллированной воды.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Постановка набора возможна в двух вариантах:

1. Инкубация без шейкирования – полное время анализа – 2 часа 15 минут
2. Инкубация с шейкированием - полное время анализа – 1 час 15 минут

- Разведите образцы буфером для образцов (3) в соотношении 1:6 (вес/объем), например, 200 мг или 200 мкл образца кала + 1.0 мл буфера для разведения образцов (3) или
- Перенесите 2-4 инокуляционные петли колоний *Clostridium difficile* в пробирку с 1,0 мл буфера для разведения образцов и тщательно перемешайте на вортексе.
- Избегайте даже незначительного сдвига времени при внесении реагентов и образцов.
- Убедитесь, что время замачивания (нахождение буфера для промывки в лунках) составляет не менее 5 секунд на каждый цикл промывки!
- Избегайте попадания света на раствор субстрата ТМВ!

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ (вариант 1 – без шейкирования):

1. Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (22-25 °С). Аккуратно перемешайте, без образования пены.
2. Внесите по:
100 мкл положительного контроля «CONTROL +» (4)
100 мкл отрицательного контроля «CONTROL -» (5)
100 мкл разведенных образцов кала или суспензии культуры
3. Закройте планшет и инкубируйте **60 мин** при 22-25 °С.
4. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
5. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «CONJ BJOTJN» (6/1)** в каждую лунку/
6. Закройте планшет и инкубируйте **30 мин** при 22- 25 °С.
7. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
8. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «CONJ STREPT» (6/2)** в каждую лунку/
9. Закройте планшет и инкубируйте **30 мин** при 22-25 °С.
10. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
11. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «SUBSTR TMB» (7)** в каждую лунку
12. Закройте планшет и инкубируйте **15 мин** при 22-25 °С защищая от света.
13. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «STOP» (8)** в каждую лунку
14. Считайте ОП при длине волны **450 нм** (длина волны сравнения ≥ 620 нм) с помощью микропланшетного ридера в течение 30 минут после остановки реакции.

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ (вариант 2 – с шейкированием):

1. Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (22-25 °С). Аккуратно

- перемешайте, без образования пены.
2. Внесите по:
100 мкл положительного контроля «CONTROL +» (4)
100 мкл отрицательного контроля «CONTROL -» (5)
100 мкл разведенных образцов кала или суспензии культуры
3. Закройте планшет и инкубируйте **30 мин** при 22-25 °С на орбитальном шейкере при 500-700 об/мин.
4. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
5. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «CONJ BJOTJN» (6/1)** в каждую лунку
6. Закройте планшет и инкубируйте **15 мин** при 22-25 °С на орбитальном шейкере при 500-700 об/мин.
7. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
8. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «CONJ STREPT» (6/2)** в каждую лунку
9. Закройте планшет и инкубируйте **15 мин** при 22-25 °С на орбитальном шейкере при 500-700 об/мин.
10. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
11. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «SUBSTR TMB» (7)** в каждую лунку
12. Закройте планшет и инкубируйте **15 мин** при 22-25 °С **без шейкирования**, защищая от света.
13. Внесите **3 капли (или 120 мкл) «STOP» (8)** в каждую лунку
14. Считайте ОП при длине волны **450 нм** (длина волны сравнения ≥ 620 нм) с помощью микропланшетного ридера в течение 30 минут после остановки реакции.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Качественная оценка

Определение уровня «cut-off»:

ОП отрицательного контроля + 0.20

Образцы, для которых ОП равна или выше значения «cut-off» должны быть признаны положительными, а образцы, для которых ОП ниже на 10% значения «cut-off» должны быть признаны отрицательными на содержание токсинов А и В *Clostridium difficile*. Образцы со значениями в диапазоне «cut-off» -- «cut-off» -10 % считаются пограничными и должны быть протестированы повторно. Если для таких образцов при повторном тестировании будет опять получен пограничный результат, то необходимо взять и протестировать новые образцы у соответствующих пациентов.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Токсины А и В *Clostridium difficile*

Отрицательные	< Cut-off x 0.9
Пограничные	0.9 x cut-off -- cut-off
Положительные	> Cut-off

Каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные референсные диапазоны нормальных и патологических значений, как это обычно делается для других диагностических параметров. Указанные выше референсные значения приводятся только как ориентировочные, которые можно ожидать.

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если:

- Средняя ОП отрицательного контроля
 ≤ 0.20 (для ручной процедуры)
 ≤ 0.30 (для автоматической процедуры)
- Средняя ОП положительного контроля
 ≥ 1.00

Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными, и тестирование должно быть повторено. Убедитесь, что процедура анализа выполняется корректно (соответствующие периоды инкубации и температуры, разведения образцов и буфера для промывок, этапы промывок и т.д.). В случае повторного невыполнения критериев достоверности обращайтесь к своему поставщику.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Нет корреляции между измеряемой ОП и тяжестью инфекции. Не допускается проводить сравнение ОП, получаемых для образцов и для положительного контроля. Перекрестная контаминация образцов и реагентов может приводить к ложноположительным результатам. Некорректные разведения, недостаточно гомогенизированные образцы или твердые частицы в образцах, оставшиеся после центрифугирования, могут давать ложноотрицательные результаты. Ферментированные

образцы со значением pH ниже 5 после ресуспендирования могут давать ложноотрицательные результаты. Образцы, обработанные формалином, могут давать ложноположительные результаты. Отрицательные результаты данного анализа не исключают инфекции.

При интерпретации любых результатов исследований методом ИФА (ELISA) необходимо учитывать результаты микробиологических исследований и полную клиническую картину.

Автоматическая процедура

Постановка данного набора на полностью автоматизированных анализаторах может привести к завышенным результатам абсорбции по сравнению с ручными методиками из-за различий в процедурах промывки и техническим характеристикам оборудования. В этих случаях для негативного контроля допускается значение абсорбции 0.3. Рекомендуется использовать процедуру промывки с 10 с замачиванием на стрип, с промывками одна за другой и 10 с замачиванием после последней промывки в цикле. При необходимости число промывок можно увеличить с 5 до 7-8.

Корреляция:

Ручная - автоматическая процедура
(см. оригинал инструкции, стр.6)

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Коэффициент вариации внутри серии (CV) при тестировании данным методом *Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* рассчитан из анализа 8 повторов образцов:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
I	1.386	0.042	3.0
II	0.506	0.017	3.3
III	0.332	0.028	8.5

Коэффициент вариации между сериями (CV) при тестировании данным методом *Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* рассчитан из анализа в 5 различных постановках в течение 2 дней, по 8 повторов каждого образца:

образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
I	1.321	0.102	7.7
II	0.485	0.034	6.9
III	0.345	0.037	10.8

Специфичность и чувствительность

Было протестировано 154 образцов кала параллельно данным методом *Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* и другим коммерчески доступным методом ELISA:

	Другой ELISA положительные	Другой ELISA отрицательные
Serazym® ELISA положительные	103	4
Serazym® ELISA отрицательные	2	45

Специфичность: 91.8 % Чувствительность: 98.0 %

Перекрестная реактивность

Не было выявлено какой-либо перекрестно реактивности при тестировании данным методом *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* образцов кала, положительных по перечисленным ниже кишечным инфекциям: *Staphylococcus aureus*, *enterotoxin forming*; *EHEC*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec. Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Негативные образцы кала насыщались $\geq 10^8$ КОЕ микроорганизмами (см. табл. в оригинале инстр. стр. 4) и протестированы с отрицательным результатом данным набором (<Cut-off). Хотя в некоторых публикациях описана перекрестная реактивность токсинов некоторых штаммов *C.sordellii* с антителами к токсинам *C. difficile*, не наблюдалось перекрестной реактивности с данным набором *C.sordellii* штамм ATCC 9714.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ – (См. Оригинал инструкции)

РЕКОМЕНДАЦИИ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

Данный набор предназначен только для использования *in vitro*.

Точно соблюдайте инструкции.

Тестирование данным методом должно проводиться только квалифицированным персоналом.

Соблюдайте сроки годности указанные на этикетках реагентов.

Обращайте внимание и соблюдайте сроки стабильности разведенных реагентов.

Не используйте и не смешивайте реагенты различных лотов, за исключением буфера для образцов, буфера для промывок, раствора субстрата TMB и стоп-раствора.

Не используйте реагенты других производителей.

Не допускайте сдвига времени во время пипетирования реагентов.

Все реагенты должны храниться при 2... 8 °С перед использованием. Некоторые реагенты содержат незначительные количества тимерозала (< 0.1 % w/v) и катона (1.0 % v/v) в качестве консервантов. Не допускайте их проглатывания или контакта с кожей или слизистыми оболочками.

Обращайтесь со всеми компонентами и образцами как с потенциально опасными.

Так как набор содержит потенциально опасные материалы, необходимо соблюдать следующие обязательные меры предосторожности:

- Не курите, не ешьте или не пейте при работе с материалами набора,
- Всегда используйте защитные перчатки,
- Никогда не пипетируйте материалы ртом,
- Обращайте внимание на меры предосторожности при работе с каждым отдельным компонентом набора.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com