

## НАБІР РЕАГЕНТІВ

# ТОКСИН А+В АНТИГЕН *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ELISA

### Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA

Кат. № : **EIA-4448**  
Кількість : **96**

Дата випуску інструкції: **03-2019**  
Версія **7.0**



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

#### 1. ВСТУП

*Clostridium difficile* – це бактерія, яка викликає госпітальну діарею у дорослих під час або після лікування антибіотиками, такими як цефалоспорини 3-го покоління (1). Хоча, 2-3% здорових дорослих та 20-50% здорових дітей колонізовані бактерією *Clostridium difficile*, інфекція, як правило, має екзогенне походження і є наслідком контакту або з працівниками лікарні, або зі спорами *Clostridium difficile*, які можуть забруднити туалети, постільну білизну тощо.

Обидва екзотоксини А і В цієї спороутворюючої бактерії викликають деполімеризацію актинових філаментів за рахунок внутрішньоклітинної ферментативної модифікації rho-білків. Отже, проникність клітинної мембрани зростає, що сприяє проникненню нейтрофілів. Це призводить до появи клінічної картини, так званої *Clostridium difficile*-асоційованої діареї та коліту або в кінцевому результаті до псевдомембранозного коліту (ПМК) (1).

Так як продукція токсинів та початок захворювання корелюють, діагностика інфекції *Clostridium difficile* заснована головним чином на безпосередньому виявленні токсинів у зразках калу. На сьогоднішній день цитотоксичний тест вважається «золотим стандартом» для виявлення токсинів *Clostridium difficile*. Останнім часом його значною мірою замінили імунологічні тести, такі як імуоферментний аналіз (2).

#### Посилання:

- Rambaud J-C., LaMont J-T. (Hrsg.): "Ökosystem Darm Special- Updates on *Clostridium difficile*" Springer Verlag 1995.
- Wilkins T.D. and Lyerly D.M. (2003): „*Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534.

#### 2. ПРИЗНАЧЕННЯ

**Набір ІФА *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag** - це *in vitro* пристрій для прямого визначення токсинів А і В *Clostridium difficile* у зразках калу та суспензійних культурах.

#### 3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Аналіз ІФА *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag - це непрямий імуоаналіз з двома сайтами для кількісного визначення обидвох токсинів А та В *Clostridium difficile* на основі поліклональних і моноклональних антитіл. Токсини *Clostridium difficile* зразків калу або суспензійних культур та позитивного контролю реагують з антитілами моноклонального антитоксину А та поліклонального антитоксину В, покритими твердою фазою мікропланшету. Після інкубації незв'язаний матеріал видалається під час етапу промивання.

Згодом, зв'язані токсини специфічно реагують з біотинільованими антитілами поліклонального антитоксину А та моноклонального антитоксину В протягом другого інкубаційного періоду. Незв'язаний матеріал відокремлюють від твердофазних імунних комплексів послідовним етапом промивання.

Під час наступного етапу інкубації, стрептавідин, кон'югований з пероксидазою хрому (HRP), реагує зі зв'язаними біотинільованими антитілами. Незв'язаний кон'югат видалається під час етапу промивання. HRP конвертує послідовно доданий безбарвний розчин субстрату 3,3', 5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) у синій колір. Ферментну реакцію зупиняють сірчаною кислотою, доданою у лунки, де розчин перетворюється із синього в жовтий.

Оптичну щільність (ОЩ) розчину, яка зчитана при 450/620 нм прямо пропорційна до специфічно зв'язаної кількості токсину А і В *Clostridium difficile*.

Після розгляду cut-off значення, результати інтерпретуються як позитивні чи негативні.

#### 4. КОМПОНЕНТИ ТЕСТУ ДЛЯ 96 ЛУНОК

1	ЛУНКИ		12
2	<b>ПРОМИВНИЙ БУФЕР КОНЦ. 10X</b>	<b>Промивний буфер</b> 10-кратний	100 мл концентрат для 1000 мл розчину біла кришка
3	<b>РОЗЧИННИК</b>	<b>Розчинник для зразка</b>	100 мл – готовий до використання жовто-чорна кришка
4	<b>КОНТРОЛЬ +</b>	<b>Позитивний контроль</b> <i>C. difficile</i> Toxin реактивний зразок	2.0 мл – готовий до використання синьо-червона кришка
5	<b>КОНТРОЛЬ -</b>	<b>Негативний зразок</b> <i>C. difficile</i> Toxin негативний зразок	2.0 мл готовий до використання синьо-зелена кришка
6/1	<b>КОН'ЮГ. БІУТИН</b>	Біотинільовані, поліклональні анти-Токсин А-(кроля) та моноклональні анти-Токсин В-антитіла (миші)	15 мл – готовий до використання зелено-біла кришка
6/2	<b>КОН'ЮГ. СТРЕПТ.</b>	<b>Стрептавідин,</b> кон'югований з пероксидазою хрому	15 мл – готовий до використання червоно-коричнева кришка
7	<b>СУБСТРАТ ТМБ</b>	<b>Субстрат</b> 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин та пероксид водню	15 мл – готовий до використання синя кришка
8	<b>СТОП</b>	<b>Стоп розчин</b> 0.25 М сірчана кислота	15 мл – готовий до використання жовта кришка

#### 5. ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

##### 5.1 Визначення токсинів зі зразків калу

##### Збір та зберігання

Зразки калу потрібно зберігати при температурі 2°C - 8°C одразу після забору та використати протягом 72 годин або заморозити при 80°C. Зберігати при температурі -20°C та уникати повторного розмороження та замороження зразків.

Зразки калу, що зберігаються у формаліні, не можна використовувати в цьому аналізі.

Зразки калу, розведені з розчинником для зразків можна зберігати до 72 год при температурі 2°C - 8°C та тестувати на наступний день.

##### Підготовка

Підігріти зразки до кімнатної температури та добре перемішати.

Піпетувати **1000 мкл** розчинника для зразків у чисту пробірку.

За допомогою одноразової скляної палички для перемішування додайте 200 мг (діаметром приблизно 2-3 мм) фекалій, якщо тверді або піпетуйте 200 мкл, якщо зразки рідкі у пробірку та ретельно суспендуйте.

При необхідності прокрутіть плаваючі частинки в мікроцентрифузі з максимальною швидкістю протягом 1 хвилини.

##### 5.2 Визначення токсинів із суспензійних культур (токсигенна культура)

Колонії *Clostridium difficile*, вирощені на крові або agarі CCFA протягом 48 годин, можна тестувати безпосередньо на наборі ІФА *Clostridium difficile* Toxin A + B.

Приготуйте бактеріальну суспензію згідно стандарту 1 Mc Farland (значення ОЩ при 600 нм: 0.20 – 0.25 після нульової компенсації жовтого розчинника для зразків):

Піпетувати **1000 мкл** розчинника для зразків у чисту пробірку.

Внесіть **2 – 4 інокуляційні петлі** *C. difficile* культури у розчинник для зразків та суспендуйте на вортесному мікшері. Зчитайте значення ОЩ при 600 нм як описано вище.

Використовуйте 100 мкл для тестування ІФА.

Якщо використовуються селективні культуральні середовища, виявлена кількість токсинів може бути зменшена за рахунок інгібуючих компонентів

таких середовищ, що призводить до зниження значень ОЩ в ІФА. Тому, використання селективних середовищ для токсигенних культур вимагає приготування бактеріальної суспензії щонайменше згідно стандарту МакФарленда 4 (ОЩ 600 нм > 1.0 після нульової компенсації розріджувачем зразка жовтого кольору). У цьому випадку, колонії *Clostridium difficile* повинні бути зібрані щонайменше половина густо вирощеної агарової пластини. За необхідності, слід дотримуватися рекомендацій та інструкцій виробників середовищ.

## 6. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- Мікропіпетки
- Багатоканалні піпетки або мульти-піпетки
- Контейнер для реагентів для багатоканалних піпеток
- 8-каналний гребінець для миття з вакуумним насосом і пляшкою для відходів або вошер для мікропланшетів або 8-каналний дозатор
- Мікропланшетний зчитувач з оптичними фільтрами на 450 нм для вимірювання та ≥620 нм для довідки.
- Дистильована або деіонізована вода
- Скляний посуд
- Пробірки (2мл) для підготовки зразка
- Орбітальний шейкер для проведення тесту варіант 2

## 7. ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 7.1 Розмір набору та термін придатності

Один набір призначений для 96 визначень. Дата закінчення терміну придатності кожного компонента вказана на відповідній етикетці, повного набору - на зовнішній етикетці коробки. Після отримання, всі компоненти слід зберігати при температурі 2°C - 8°C, рекомендована зберігати в оригінальній упаковці. За умови відповідного зберігання, після відкриття всі компоненти набору стабільні протягом 2 місяців. Цей готовий до використання промивний розчин стабільний протягом одного місяця за умови зберігання при температурі 2°C - 8°C.

### 7.2 Підготовка реагентів

Перед використанням в аналізі дозволити всім компонентам досягнути кімнатної температури.

Мікротитровий планшет герметично закритий у фользі з осушувачем. Планшет складається з рамки та стрипів з відривними лунками. Перед відкриттям планшет має бути кімнатної температури. Невикористані лунки слід зберігати в холодильнику та захищати від вологи в оригінальній упаковці, ретельно закритими. Підготуйте необхідну кількість миючого розчину, розводячи 10-кратним концентрований *Миючий буфер 1+9* з дистильованою або деіонізованою водою.  
Наприклад: 10 мл концентрату *Миючого розчину* + 90 мл дистильованої або деіонізованої води.

## 8. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Даний аналіз можна виконувати двома способами:

1. Інкубування без струшування;  
тривалість тесту 2 години та 15 хвилин
  2. Інкубування зі струшуванням;  
Тривалість тесту 1 година і 15 хвилин
- Розведіть зразки розчинником для зразків (3) 1:6 напр., 200 мг або 200 мкл калу + 1.0 мл розчинника для зразка (3) -або-  
Внесіть 2-4 інокуляційні лупи колонії *C. Difficile* у пробірку з 1.0 мл розчинника для зразка (3) та ретельно перемішати на вортексі.
  - Унікати порушень у часі під час внесення реагентів та зразків
  - Час замочування буфера для промивання в лунках становить 5 секунд на один цикл миття.
  - Унікати прямого впливу світла на розчин субстрату ТМБ.

### 8.1 Етапи роботи варіант 1: без струшування

1. Нагріти всі реагенти до кімнатної температури перед використанням. Обережно перемішати, щоб не уворилася піна.
2. Піпетувати:  
**100 мкл КОНТРОЛЮ** + позитивного контролю (4)  
**100 мкл КОНТРОЛЮ** - негативного контролю (5)  
**100 мкл** розведеного зразка калу або культуральної суспензії
3. Накрийте планшет та інкубуйте протягом 60 хв при КТ.
4. Декантувати, потім промити кожну лунку 5 разів з **300 мкл** миючого розчину (розведеного з (2)) та поставити для висихання на абсорбуючий папір.
5. Внесіть **3 краплі (або 120 мкл)** КОН'ЮГ. БІОТИНУ біотин-кон'югату (6/1) на лунку.
6. Накрийте планшет та інкубуйте при 30 хв при КТ.
7. Декантувати, потім промити кожну лунку 5 разів з **300 мкл** миючого розчину (розведеного з (2)) та поставити для висихання на абсорбуючий папір.

8. Внесіть **3 краплі (або 120 мкл)** КОН'ЮГ. СТРЕПТ. стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою хрому (6/2) на лунку.
9. Накрийте планшет та інкубуйте протягом 30 хв при КТ.
10. Декантувати, потім промити кожну лунку **5 разів з 300 мкл** миючого розчину (розведеного з (2)) та поставити для висихання на абсорбуючий папір.
11. Внести 3 краплі (або 120 мкл) СУБСТР. ТМБ субстрату (7) на лунку.
12. Інкубувати протягом 15 хв при КТ, захищеним від світла.
13. Внести **3 краплі (або 120 мкл)** СТОП стоп розчину (8) на лунку, обережно перемішати.
14. Зчитати ОЩ при 450 нм/≥ 620 нм з мікропланшетним зчитувачем протягом 30 хв після припинення реакції.

### 8.2 Етапи роботи варіант 1: зі струшуванням

1. Нагріти всі реагенти до кімнатної температури (КТ) перед використанням. Обережно перемішати, щоб не утворилася піна.
2. Піпетувати:  
**100 мкл КОНТРОЛЮ** + позитивного контролю (4)  
**100 мкл КОНТРОЛЮ** - негативного контролю (5)  
**100 мкл** розведеного зразка калу або культуральної суспензії
3. Накрийте планшет та інкубуйте протягом 30 хв при КТ на орбітальному шейкері при частоті 500-700/хв.
4. Декантувати, потім промити кожну лунку **5 разів з 300 мкл** миючого розчину (розведеного з (2)) та поставити для висихання на абсорбуючий папір.
5. Внести 3 краплі (або 120 мкл) КОН'ЮГ. БІОТИНУ біотин-кон'югату (6/1) на лунку.
6. Накрийте планшет та інкубуйте протягом 15 хв при КТ на орбітальному шейкері при частоті 500-700/хв.
7. Декантувати, потім промити кожну лунку 5 разів з 300 мкл миючого розчину (розведеного з (2)) та поставити для висихання на абсорбуючий папір.
8. Внесіть **3 краплі (або 120 мкл)** КОН'ЮГ. СТРЕПТ. Стрептавідин, кон'югований пероксидазою хрому (6/2) на лунку.
9. Накрийте планшет та інкубуйте протягом 15 хв при КТ на орбітальному шейкері при частоті 500-700/хв.
10. Декантувати, потім промити кожну лунку **5 разів з 300 мкл** миючого розчину (розведеного з (2)) та поставити для висихання на абсорбуючий папір.
11. Внести **3 краплі (або 120 мкл)** СУБСТР ТМБ субстрату (7) на лунку.
12. Інкубувати протягом 15 хв при КТ не струшуючи та захищаючи від світла.
13. Внесіть **3 краплі (або 120 мкл)** СТОП стоп розчину (8) на лунку, обережно перемішайте.
14. Зчитайте ОЩ при 450 нм /≥ 620 нм з мікропланшетним зчитувачем протягом 30 хв після припинення реакції.

## 9. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТУ

### Якісне оцінювання

#### Cut-off визначення:

**ОЩ негативний контроль + 0.20**

Зразки з абсорбціями вищими, ніж значення cut-off вважаються **позитивними**, а зразки з абсорбціями 10% нижче значення cut-off вважаються **негативними** для антигену *Clostridium difficile* toxin A+B. Зразки, що знаходяться на 10% нижче cut-off значення до cut-off значення, слід вважати **граничними** і повинні бути повторно перевірені. У разі повторного граничного результату, слід досліджувати другий зразок відповідного пацієнта.

## 10. РЕФЕРЕНСНІ ЗНАЧЕННЯ

### *Clostridium difficile* Toxin A+B

Позитивне	> Cut-off
Граничне	0.9 x Cut-off – Cut-off
Негативне	≤ 0.9 x Cut-off

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні та патологічні діапазони, як це зазвичай робиться і з іншими діагностичними параметрами. Отже, зазначені референсні значення є орієнтиром для значень, яких можна очікувати.

### 10.1 Дійсність тесту

#### Тестовий пробіг дійсний тоді, коли:

- Середнє значення ОЩ ≤0.20 (проведення тесту вручну негативного контролю становить ≤0.30 (автоматичне проведення))
- Середнє значення ОЩ ≥1.00 позитивного контролю становить

Якщо вищезазначених критеріїв якості не дотримано, повторіть тест та перевірте чи тест було проведено правильно (час та температури

інкубації, розчинник для зразка та промивного буферу, етапи миття та ін.) у випадку повторної невдачі критеріїв якості, зверніться до постачальника.

## 10.2 Обмеження процедури

Не існує зв'язку між вимірною абсорбцією поглинанням та складністю інфекції. Також, не дозволяється співвідносити абсорбцію зразків з позитивним контролем.

Перехресне забруднення реагентів та зразків може давати неправильні позитивні результати. Неправильні розведення, недостатньо гомогенізовані зразки або тверді частинки після центрифугування суспензії можуть давати неправильні негативні так як і неправильні позитивні результати.

Зразки, оброблені формаліном, можуть спричинити помилкові позитивні результати.

Негативний результат тесту ІФА Clostridium difficile Toxin A+B не виключає інфекції:

Загальна інтерпретація результатів ІФА завжди повинна враховувати мікробіологічне дослідження, а також клінічні результати.

## 10.3 Автоматична обробка

Виконання ELISA Clostridium difficile Toxin A + B на повністю автоматизованих процесорах мікропланшетів (наприклад, DS2, DSX), може викликати підвищені поглинання в порівнянні з ручною процедурою через індивідуальні відмінності щодо процедур миття та загальних технічних характеристик обладнання. У цих випадках для негативного контролю допустиме максимальне значення 0.3 одиниці поглинання.

Рекомендується використовувати процедуру миття, що включає 10 секунд замочування на одну смужку, і етап миття з подальшим промиванням дистильованою або деіонізованою водою із замочуванням на 10 секунд після останнього етапу промивання кожного циклу миття. При необхідності, кількість етапів миття можна збільшити від 5 до 7-8 разів.

## Кореляція:

Ручна – автоматична обробка:

Панель зі 125 зразками калу досліджували паралельно ручним та автоматичним методом обробки (DS2, Dупех Technologies). Кореляцію було обчислено з  $r = 0.976$ .

## 11 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 11.1 Точність

Коефіцієнт варіації (KB) в аналізі у Clostridium difficile Toxin A+B ELISA обчислили з 8-кратним визначенням зразків:

Зразок	Середнє значення ОЦ	Стандартне відхилення	KB (%)
I	1.386	0.042	3.0
II	0.506	0.017	3.3
III	0.332	0.028	8.5

Коефіцієнт варіації (KB) між аналізами у Clostridium difficile Toxin A+B ELISA у 5 різних випробних пробігах у 2 різні дні від 8-кратного визначення зразків:

Зразок	Середнє значення ОЦ	Стандартне відхилення	KB (%)
I	1.321	0.102	7.7
II	0.485	0.034	6.9
III	0.345	0.037	10.8

### 11.2 Специфічність та чутливість

Взагалом, було протестовано 154 зразки калу паралельно з Clostridium difficile Toxin A+B ELISA та іншим комерційно доступним ІФА.

	Порівняльний ІФА позитивний	Порівняльний ІФА негативний
DRG ELISA позитивний	103	4
DRG ELISA негативний	2	45

Специфічність: 91.8 %

Чутливість: 98.0%

### 11.3 Перехресна реактивність

Зразки фекалій, позитивні для однієї з наступних кишкових бактерій, не виявляли жодної перехресної реакції в Clostridium difficile Toxin A + B Ag ELISA:

Staphylococcus aureus, ентеротоксин негативний;

Staphylococcus aureus, ентеротоксин позитивний;

EHEC; Pseudomonas aeruginosa; Salmonella typhimurium; Salmonella enteritidis; Salmonella spec. Aeromonas hydrophila; Aeromonas caviae; Campylobacter spec.; Hafnia alvei; Yersinia enterocolitica O:3.

Негативні зразки стільця змішали з  $\geq 10^8$  колоніями, що утворюють одиниці наступних мікроорганізмів і протестували, що вони є негативними за допомогою ІФА (ОЦ 450/620 нм <Cut-off):

Aeromonas hydrophila	(ATCC 7966)
Bacillus cereus	(ATCC 11778)
Bacillus subtilis	(ATCC 6633)
Bacteroides fragilis	(ATCC 25285)
Candida albicans	(ATCC 10231)
Campylobacter coli	(ATCC 33559)
Campylobacter jejuni	(ATCC 33291)
Citrobacter freundii	(ATCC 8090)
Clostridium sordellii	(ATCC 9714)
Enterobacter aerogenes	(ATCC 13048)
Enterobacter cloacae	(ATCC 13047)
Enterococcus faecali	(ATCC 29212)
Escherichia coli	(ATCC 25922)
Klebsiella pneumoniae	(ATCC 13883)
Peptostreptococcus anaerobius	(ATCC 27337)
Proteus vulgaris	(ATCC 8427)
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 10145)
Salmonella enterica Serovar enteritidis	(ATCC 13076)
Salmonella enterica Serovar typhimurium	(ATCC 14028)
Shigella flexneri	(ATCC 12022)
Shigella sonnei	(ATCC 25931)
Staphylococcus aureus	(ATCC 25923)
Staphylococcus epidermidis	(ATCC 12228)
Vibrio parahaemolyticus	(ATCC 17802)

Штам C. sordellii ATCC 9714 не реагує перехресно у ІФА Clostridium difficile Toxin A + B, хоча деякі публікації описують перехресну реакційну здатність токсинів деяких штамів C. sordellii з антитілами до токсину C. difficile.

## 12. ЗАГАЛЬНІ ПОРАДИ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Цей набір призначений тільки для діагностики in vitro.** Чітко дотримуйтеся інструкцій. Набір можуть використовувати тільки кваліфіковані працівники. Не використовувати реагенти з пошкоджених упаковок або пляшок. Дотримуйтеся терміну придатності, який вказаний на етикетці.

**Не використовуйте та не перемішуйте реагенти з різних лотів, за винятком розчинника для зразків. Промивного буфера, ТМБ/розчину субстрату та стоп розчину.**

**Розчинник для зразків, буфер для промивання, розчин ТМБ/ субстрат і стоп-розчин загальноприйнятні для таких ІФА стільців DRG: Adenovirus Ag ELISA (EIA 4451), Rotavirus Ag ELISA (EIA-4455), Astrovirus Ag ELISA (EIA-4456), Норовірус ELISA (EIA-5694), Clostridium difficile Toxin A + B Ag ELISA (EIA-4448), Entamoeba histolytica Ag ELISA (EIA-4454) та Giardia lamblia Ag ELISA (EIA-4453).**

Не використовувати реагенти інших виробників.

Уникати зміщення часу під час додавання реагентів.

Всі реагенти потрібно зберігати при температурі 2°C - 8°C перед використанням.

Деякі реагенти можуть містити біоциди в якості консерванту. Більше інформації можете знайти у паспорті безпеки хімічної продукції. Не ковтати та уникати попадання на шкіру та слизові оболонки. Поводитися зі всіма компонентами та зі зразками пацієнтів як з потенційно небезпечними.

Оскільки, набір містить потенційно небезпечні матеріали, слід дотримуватися наступних заходів безпеки:

- Не курити, не їсти та не пити під час користування набором.
- Завжди користуйтеся захисними рукавичками.
- Ніколи не піпетуйте матеріал ротом.
- Зверніть увагу на заходи безпеки щодо окремих компонентів набору.



#### **ВИРОБНИК**

ДРГ Інструментс ГмбХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drq-diagnostics.de](http://www.drq-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### **УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

