

ProSpecT

Campylobacter, stanovení na mikrotitračních destičkách

REF R247609696 testů

CS

1. POUŽITÍ

Stanovení ProSpecT™ Campylobacter na mikrotitračních destičkách je enzymová imunoanalýza IN VITRO na mikrotitračních destičkách (EIA) pro kvalitativní detekci specifického antigenu *Campylobacteru* ve vzorcích stolice a fekálních kulturách pomnožených v bujonu. Stanovení ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách je určeno pro použití jako pomůcka při stanovení diagnózy infekcí *Campylobacterem*.

2. SHRnutí

Enteropatogenní bakterie *Campylobacter jejuni* je známa jako jedno z hlavních etiologických agens akutního průjmu u člověka^{1,2,3}. Je hlavní příčinou bakteriálního průjmu v USA a je příčinou více onemocnění než *Salmonella* a *Shigella* dohromady^{4,5}. I když je toto onemocnění rozšířené po celém světě, je zvláště závažné v rozvojových zemích. Infekce vyvolané *Campylobacterem jejuni* způsobují průjem, který může být vodnatý a obsahovat krev, obvykle okultně, a fekální leukocyty⁶. Mezi další symptomy patří horečka, bolest břicha, nevolnost, bolesti hlavy a svalové bolesti. Onemocnění se projeví 2 - 5 dnů po požití kontaminované potravy nebo vody a může trvat 7 - 10 dní. Většina infekcí mizí spontánně a antibiotická léčba není nutná⁹. Komplikace jsou vzácné, bylo však hlášeno, že souběžně s infekcemi se může projevit reaktivní artritida, hemolyticko-uremický syndrom, meningitida, rekurentní kolitida, akutní cholecystitida a syndrom Guillain-Barré⁴. Děti mladší 5 let a mladí dospělí (ve věku 15 - 29 let) jsou infekcemi *Campylobacter jejuni* postiženi častěji než jiné věkové skupiny.

Stanovení diagnózy infekcí kamylobakteriízy v současné době spočívá v izolaci a kultivaci organismu v pomnožovacím bujonu a na selektivních médiích obsahujících řadu přidaných antibiotik v mikroaerofilní atmosféře obsahující 5 % kyslíku a 10 % oxidu uhličitého. Izolace může trvat 2 dny až týden.

Specifický antigen *Campylobacteru* je povrchový antigen *Campylobacteru*. Stanovením western blot byly zjištěny 2 proužky s molekulovou hmotností cca 15 Kd a 66 Kd. Studie zkřížené reaktivity ukazují, že se jedná o antigen společný pro *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*.

3. PRINCIP TESTU

Stanovení ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách je imunoanalýza na pevné fázi pro detekci specifického antigenu *Campylobacteru*. Naředěné vzorky stolice se přidají do jamek odlamovacích mikrotitračních destiček, na něž je navázána králičí polyklonální protilátka proti specifickému antigenu *Campylobacteru*. Je-li přítomen specifický antigen *Campylobacteru*, je „zachycen“ navázanou protilátkou. Jamky se inkubují a poté se promyjí, aby se odstranil nenavázaný materiál.

Přidá se enzymový konjugát (polyklonální králičí protilátka proti specifickému antigenu *Campylobacteru* značená enzymem - křenovou peroxidázou). Jamky se inkubují a poté se promyjí, aby se odstranil nenavázaný enzymový konjugát. Při pozitivní reakci naváže zachycený specifický antigen *Campylobacteru* enzymový konjugát na jamku. Přidá se substrát enzymu, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Při pozitivní reakci enzym navázaný na jamku specifickým antigenem *Campylobacteru* přemění substrát na barevný reakční produkt. Vznik zbarvení lze detekovat vizuálně nebo spektrofotometricky. Při negativní reakci není přítomen žádný specifický antigen *Campylobacteru* nebo je přítomno nedostatečné množství antigenu, které neumožňuje navázání enzymového konjugátu a nevytvoří se žádný barevný reakční produkt.

4. DEFINICE SYMBOLŮ

REF	Katalogové číslo
IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Obsah postačuje pro <n> testů
	Prostudujte návod k použití
	Teplotní omezení (skladovací teplota)
LOT	Číslo šarže (č. šarže)
	Datum ukončení použitelnosti (datum expirace)
	Výrobce
DILUTED SAMPLE	Ředění vzorek

5. OBSAH SOUPRAVY, PŘÍPRAVA K POUŽITÍ A SKLADOVÁNÍ

Stanovení ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách obsahuje činidla postačující pro  96 testů.

Viz též **Upozornění**, část 6.

Datum expirace každé soupravy je uvedeno na štítku obalu.

Všechny složky uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C.

Před použitím vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (20 - 25 °C) a jemně je promíchejte. Po použití vraťte nespotřebovaná činidla do chladničky.

Všechna činidla kromě promývacího pufru jsou dodávána v pracovní koncentraci. Činidla lze dávkovat přímo z lahviček s kapátkem nebo je lze odlít pro použití s vícekanálovými pipetami. Pokud jste odlili nadměrné množství činidla, přebytek činidla zlikvidujte. Nelijte přebytek činidla zpět do láhve.



Návod k použití

Pipety pro přenos roztoků

Držák a kryt proužků mikrotitračních destiček Karta s postupem

Mikrotitrační destička* (8 jamek/proužek)

6 proužků (R2476048) nebo 12 proužků (R2476096) potažených králičí polyklonální protilátkou proti specifickému antigenu *Campylobacteru*. Nepoužité proužky mikrotitračních destiček skladujte v plastovém sáčku obsahujícím vysoušedlo zabraňující přístupu vlhkosti.

CONJUGATE

CONTROL +

CONTROL -

SAMPLE DILUENT

WASH BUFFER (x10)

SUBSTRATE TMB

STOP SOLUTION

Enzymový konjugát*

Jedna lahvička s kapátkem obsahující 12 ml (R2476048) nebo 25 ml (R2476096) králičí polyklonální protilátky proti specifickému antigenu *Campylobacteru* značené křenovou peroxidázou s antimikrobiálními látkami.

Pozitivní kontrolní vzorek

Jedna lahvička s kapátkem obsahující 4 ml dezaktivovaného supernatantu kultury *Campylobacter jejuni* suspendovaného v pufrovaném roztoku s fetálním hovězím sérem a antimikrobiálními látkami.

Negativní kontrolní vzorek

Jedna lahvička s kapátkem obsahující 4 ml pufrovaného roztoku s králičím sérem, červeným barvivem a antimikrobiálními látkami.

Pufr pro ředění vzorků

Jedna lahvička obsahující 120 ml pufrovaného roztoku s králičím sérem, červeným barvivem a antimikrobiálními látkami.

Promývací pufr

Jedna lahvička obsahující 120 ml (10x) koncentrovaného pufrovaného roztoku s antimikrobiálními látkami.

Naředte 10x koncentrovaný promývací pufr na koncentraci 1x přidáním 1 dílu koncentrátu do 9 dílů destilované nebo deionizované vody. Naředěný promývací pufr je stabilní po dobu 1 měsíce, je-li skladován při teplotě 2 - 8 °C.

Barevný substrát

Jedna lahvička s kapátkem obsahující 12 ml (R2476048) nebo 25 ml (R2476096) 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) v pufru. Barevný substrát uchovávejte v lahvičce chráněné před světlem, v níž se dodává, a k dávkování ho odebírejte z této lahvičky. Pokud z jakéhokoli důvodu z původní lahvičky odeberete alikvotní díl, nevracejte nespotřebovaný barevný substrát do původní lahvičky.

Zastavovací roztok

Jedna lahvička s kapátkem obsahující 12 ml 0,46mol/l kyseliny sírové.

*Poznámka: Nezaměňujte činidla souprav s různým číslem šarže. 6. UPOZORNĚNÍ

IVD

Činidla jsou určena pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

Určeno pouze pro odborné použití.

Informace o potenciálně nebezpečných složkách si laskavě vyhledejte v příslušném bezpečnostním listu a na označení výrobku.

ZDRAVOTNÍ A BEZPEČNOSTNÍ INFORMACE

6.1. Činidla jsou připravena z biologických materiálů a je nutné s nimi manipulovat jako s potenciálně infekčním materiálem. Při likvidaci použijte odpovídající postupy pro biologicky nebezpečné materiály.

6.2. Nepipetujte ústy. Při manipulaci se vzorky a provádění stanovení používejte rukavice na jedno použití a prostředky na ochranu zraku. Po skončení práce si důkladně umyjte ruce.

6.3. Vzorky mohou obsahovat potenciálně infekční agens a při manipulaci s nimi je nutné aplikovat stupeň biologické nebezpečnosti 2 podle doporučení příručky CDC/NIH „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ (Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích), 5. vydání.

6.4. Promývací pufr obsahuje látku potenciálně senzibilizující kůži (< 1 % obj.). Zamezte styku s kůží. Používejte jednorázové nitrilové rukavice nebo rukavice z PVC.

6.5. Pro likvidaci použitého promývacího pufru použijte vhodné nádoby určené pro biologicky nebezpečné materiály.

ANALYTICKÉ POKYNY

6.6. Důkladně si přečtěte a dodržujte všechny pokyny uvedené v tomto návodu k použití.

6.7. Kromě koncentrátu promývacího pufru se činidla dodávají v potřebné pracovní koncentraci. Činidla neřeďte kromě případů, které jsou uvedeny v pokynech.

6.8. Nepoužívejte činidla po uplynutí data expirace. Datum expirace je vytištěno na štítku každého činidla. Použití činidel po uplynutí data expirace může ovlivnit přesnost výsledků.

6.9. Následující společná činidla lze používat pro celou řadu výrobků ProSpecT: promývací pufr, barevný substrát a zastavovací roztok.

6.10. Mikrobiální kontaminace činidel může snižovat přesnost stanovení. Při odebírání alikvotních dílů z lahviček s činidly používejte sterilní jednorázové pipety, zabráníte tak mikrobiální kontaminaci činidel.

6.11. Před použitím nechte všechna činidla a vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu (20 - 25 °C).

6.12. Proužky mikrotitračních destiček musejí být skladovány v uzavíratelném plastovém sáčku obsahujícím vysoušedlo, které chrání mikrotitrační destičky před přístupem vlhkosti.

6.13. Vzorky stolice musejí být před zpracováním vzorků důkladně promíchány, aby se zajistilo přesné reprezentativní zastoupení vzorku. VZORKY PŘED PROVEDENÍM TESTU NEKONCENTRUJTE.

6.14. Barevný substrát je citlivý na působení světla. Je-li činidlo vystaveno světlu a dojde k zbarvení, činidlo musí být zlikvidováno.

6.15. Osoby, které jsou barvoslepe nebo zrakově postižené, nemusí být schopny provést odečet testu a měly by pro interpretaci výsledků používat hodnoty zjištěné při spektrofotometrickém měření.

6.16. V průběhu celého testu přidávejte činidla do testovacích jamek ve stejném pořadí. Nedotýkejte se tekutiny v jamkách špičkou kapátka, aby se zabránilo kontaminaci.

6.17. Každou inkubaci provádějte přesně stanovenou dobu. Dobu začněte měřit po přidání činidla do poslední jamky na každé testované mikrotitrační destičce. Nezpracovávejte najednou více než tři destičky o 96 jamkách, aby byla zajištěna přesná doba inkubace. Odchylení od určeného postupu může mít vliv na výsledek stanovení.

6.18. Je důležité, abyste lahvičky s kapátkem drželi svisle, aby se na špičce ústí kapátka vytvořila kapka. Pokud se ústí kapátka namočí, vytvoří se kapka nesprávné velikosti okolo jeho konce a nikoli na jeho špičce; pokud k tomu dojde, nejdříve ústí kapátka otřete a teprve poté pokračujte dále.

7. ODBĚR VZORKŮ STOLICE

Při přímém testování vzorků stolice budou optimální výsledky dosaženy, pokud bude stolice testována okamžitě po přijetí do laboratoře. Při testování bujonu s pomnoženou kulturou by vzorky stolice měly být přidány do pomnožovacího bujonu okamžitě po doručení do laboratoře.

ČERSTVÉ VZORKY Nekonzervované vzorky stolice mohou být skladovány při teplotě 2 - 8 °C a testovány do 72 hodin.

Vzorky lze naředit v poměru 1:3 v roztoku pro ředění bakteriálních vzorků a před testováním mohou být uchovávány v chladničce při 2 - 8 °C po dobu až 72 hodin.

ZMRAZENÉ VZORKY Pokud bude testování provedeno za více než 72 hodin, uchovávejte stolici při teplotě -20 °C nebo nižší. Zabráňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků.

TRANSPORTNÍ MÉDIUM CARY BLAIR Vzorky stolice odebrané do transportního média Cary Blair by měly být uchovávány v chladničce při teplotě 2 - 8 °C a testovány během 1 týdne od odběru.

8. POSTUP TESTU

POTŘEBNÉ DODANÉ MATERIÁLY

Viz **Obsah soupravy, část 5.**

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Nádoby pro odběr vzorků stolice
Časovač pro měření času v minutách
Stříčka na promývací pufr
Destilovaná nebo deionizovaná voda

VOLITELNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Čtečka mikrotitračních destiček schopná odečtu při 450 nm nebo 450/620 až 650 nm
Aplikační tyčinky s koncem obalným bavlnou nebo viskóзовým hedvábím
Mikropipeta na dávkování objemů do 200 µl
Plastové nebo skleněné jednorázové zkumavky
Míchačka vortex s adaptérem pro destičky nebo třepačka

POSTUP

8.1. **Příprava vzorků pro stanovení:** Vzorky v transportním médiu Cary Blair lze přidat přímo do jamek mikrotitračních destiček za účelem testování (viz krok 8.4 níže). Promíchejte vzorky v transportním médiu před přenesením na mikrotitrační destičku.

Čerstvé vzorky stolice nebo kultury pomnožené v bujonu musejí být naředěny (viz rámeček A nebo B níže).

A	Přímé testování stolice - čerstvé, nekonzervované vzorky
1	Přidejte 0,6 ml roztoku pro ředění bakteriálních vzorků do čisté jednorázové plastové nebo skleněné zkumavky.

2	Promíchejte stolici co nejdůkladněji.
3	V případě tekuté a polotuhé stolice použijte pipetu pro přenos vzorku, kterou přenesete asi 0,3 ml vzorku (třetí značka od špičky pipety). Vytlačte vzorek do roztoku pro ředění bakteriálních vzorků a promíchejte tak, že obsah jednou nasajete a znovu vypustíte. Ponechte pipetu pro přenos vzorku ve zkumavce.
4	V případě tuhé stolice použijte aplikační tyčinku a přenešte 0,3 g vzorku (průměr cca 6 mm). Pomocí aplikační tyčinky vytvořte ze vzorku v roztoku pro ředění bakteriálních vzorků emulzi. Vložte pipetu pro přenos vzorku do zkumavky a promíchejte obsah zkumavky tak, že obsah jednou natáhnete do pipety a zase ho vypustíte. Ponechte pipetu pro přenos vzorku ve zkumavce.
5	PŘEJDĚTE KE KROKU 8.2.

B	Metoda s bujonem pro vzorky v pomnožovacím bujonu
1	Naočkujte 150 µl nebo 3 kapky stolice do 5 ml GN bujonu podle Hajna.
2	Inkubujte při teplotě 35 ± 2 °C při okolních atmosférických podmínkách po dobu 18 - 24 hodin.
3	Přidejte 0,6 ml roztoku pro ředění bakteriálních vzorků do čisté zkumavky 12 x 75 mm.
4	Přenešte 0,3 ml kultury pomnožené v bujonu do 0,6 ml roztoku pro ředění bakteriálních vzorků pomocí pipety pro přenos vzorků. Ponechte pipetu pro přenos vzorku ve zkumavce.
5	PŘEJDĚTE KE KROKU 8.2.

8.2. Otevřete plastový sáček, vyjměte z něj potřebný počet proužků mikrotitračních destiček a vložte je do držáku proužků mikrotitračních destiček. Jednu jamku použijte pro negativní kontrolní vzorek a jednu jamku pro pozitivní kontrolu. Pokud použijete méně než 8 jamek, odlomte potřebný počet jamek z proužku a vraťte nepoužité jamky do plastového sáčku s vysoušelem. **SÁČEK OPĚT TĚSNĚ UZAVŘETE, ABYSTE ZABRÁNILI PŘÍSTUPU VLHKOSTI A VRAŤTE HO DO CHLADNIČKY.**

8.3. Přidejte **4 kapky** (200 µl) negativního kontrolního vzorku do jamky A1. Přidejte **4 kapky** (200 µl) pozitivního kontrolního vzorku do jamky B1.

8.4. Pipetou pro přenos vzorků přidejte **4 kapky** naředěného vzorku, kultury pomnožené v bujonu nebo **4 kapky** vzorku v transportním médiu do každé jamky. Poznámka: Vložte otvor pipety pro přenos vzorků do jamky tak, abyste zabránili rozstříknutí do okolních jamek.

8.5. **Zakryjte** mikrotitrační destičku a inkubujte ji při pokojové teplotě (20 - 25 °C) po dobu **60 minut**. Čas začněte měřit po přidání posledního vzorku.

8.6. Obsah jamek vytřepejte nebo odsajte. Promyjte tak, že každou jamku zcela naplníte **zředěným** promývacím pufrům (~350 - 400 µl/jamku). Po každém promytí z jamek vytřepejte nebo odsajte veškerou tekutinu. Promíchejte celkem **třikrát**. Po posledním promytí odstraňte obsah a uhoďte destičkou na čisté papírové utěrky nebo ji odsajte. Odstraňte maximální možné množství promývacího pufru, ale nikdy nenechte jamky vyschnout.

8.7. Do každé jamky přidejte **4 kapky** (200 µl) enzymového konjugátu.

8.8. **Zakryjte** mikrotitrační destičku a inkubujte ji při pokojové teplotě (20 - 25 °C) po dobu **30 minut**.

8.9. Jamky vytřepejte nebo je odsajte a každou jamku **pětkrát** promyjte jako v kroku 8.6.

8.10. Přidejte **4 kapky** (200 µl) barevného substrátu do každé jamky.

8.11. **Zakryjte** mikrotitrační destičku a inkubujte ji při pokojové teplotě (20 - 25 °C) po dobu **10 minut**.

8.12. Přidejte **1 kapku** (50 µl) zastavovacího roztoku do každé jamky. Jemně jamkami poklepejte nebo je promíchejte na míchače vortex, dokud nebude žluté zbarvení rovnoměrné. Odečtěte reakce během **10 minut** po přidání zastavovacího roztoku.

8.13. Výsledek stanovte vizuálně nebo pomocí spektrofotometru při 450 nm (jedna vlnová délka) nebo při 450/620 až 650 nm (dvě vlnové délky).

9. ŘÍZENÍ JAKOSTI

Positivní a negativní kontrolní vzorky musejí být součástí stanovení při každém testu. Positivní a negativní kontrolní vzorky slouží jako kontrola činidel a kontrola postupu stanovení. Kontrolní vzorky jsou určeny pro monitorování závažných chyb činidel. Positivní kontrolní vzorek nezajistí přesnost při mezní hodnotě stanovení.

Optická hustota (O.D.) negativního kontrolního vzorku by měla být < 0,100 při 450 nm nebo < 0,070 při 450/620 až 650 nm. Negativní kontrolní vzorek by měl být při vizuálním stanovení bezbarvý. Má-li negativní kontrolní vzorek žluté zbarvení, které na kartě s postupem odpovídá intenzitě 1+ nebo vyšší, je nutné test zopakovat a věnovat při tom důkladnou pozornost promývacímu postupu.

Optická hustota pozitivního kontrolního vzorku by měla být > 0,500 při 450 nebo 450/620 až 650 nm. Vizuálně by intenzita zbarvení pozitivního kontrolního vzorku měla být stejná nebo vyšší než reakce o intenzitě zbarvení 2+ na kartě s postupem. Pokud je intenzita zbarvení nižší, požádejte telefonicky o technickou asistenci.

10. VÝSLEDKY

Interpretace zbarvení naleznete na přiložené kartě s postupem. VIZUÁLNÍ STANOVENÍ

10.1. Odečtěte výsledky testu srovnáním s barvami reakce uvedenými na kartě s postupem.

Pozitivní: Žluté zbarvení minimálně o intenzitě 1+.

Negativní: Bezbarvé.

Nelze stanovit: Slabě žluté zbarvení o intenzitě nižší než 1+.

10.2. Interpretace výsledků vizuálního stanovení:

Pozitivní: Pokud v testovací jamce vznikne zbarvení alespoň o intenzitě 1+, obsahuje vzorek specifický antigen *Campylobacteru* a test je pozitivní.

Negativní: Bezbarvá reakce představuje negativní výsledek a indikuje, že testovaný vzorek neobsahuje žádný specifický antigen *Campylobacteru* nebo nedetekovatelné množství specifického antigenu *Campylobacteru*.

Nelze stanovit: Pokud vznikne slabě žluté zbarvení o intenzitě nižší než 1+, výsledek testu nelze stanovit. Testy, jejichž výsledek nelze stanovit, je nutné zopakovat. Pokud jsou výsledky opakovaného testu pozitivní, je vzorek pozitivní. Pokud jsou výsledky opakovaného testu negativní, je vzorek negativní. Pokud opět nelze stanovit výsledky opakovaného testu, je nutné získat a testovat nový vzorek.

SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ

10.3. Změřte výsledky při jedné (450 nm) nebo dvou (450/620 až 650 nm) vlnových délkách.

10.4. Naměřené hodnoty výsledků testu:

A. Jediná vlnová délka	Čerstvá stolice	Transportní médium/bujon
Negativní:	O.D. < 0,130	< 0,100
Nelze stanovit:	O.D. 0,130 - 0,170	0,100 - 0,130
Pozitivní:	O.D. > 0,170	> 0,130
B. Dvě vlnové délky	Čerstvá stolice	Transportní médium/bujon
Negativní:	O.D. < 0,100	< 0,070
Nelze stanovit:	O.D. 0,100 - 0,140	0,070 - 0,100
Pozitivní:	O.D. > 0,140	> 0,100

10.5. Interpretace výsledků spektrofotometrického stanovení:

Pozitivní: Je-li změřená hodnota optické hustoty podle typu vzorku vyšší než indikovaná mezní hodnota pro jedinou vlnovou délku nebo dvě vlnové délky, je pozitivní a indikuje přítomnost specifického antigenu *Campylobacteru*.

Negativní: Je-li výsledek optické hustoty podle typu vzorku nižší než indikovaná mezní hodnota pro jedinou vlnovou délku nebo dvě vlnové délky, je negativní a indikuje, že v testovaném vzorku není přítomen žádný specifický antigen *Campylobacteru* nebo je v něm přítomno nedetekovatelné množství specifického antigenu *Campylobacteru*.

Nelze stanovit: Hodnoty optické hustoty, které podle typu vzorku spadají do indikovaného rozmezí, v němž nelze výsledky stanovit, jsou nestanovitelné. Testy, jejichž výsledek nelze stanovit, je nutné zopakovat. Pokud jsou výsledky opakovaného testu pozitivní, je vzorek pozitivní. Pokud jsou výsledky opakovaného testu negativní, je vzorek negativní. Pokud opět nelze stanovit výsledky opakovaného testu, je nutné získat a testovat nový vzorek.

Nestanovitelný výsledek je výsledek testu, jehož výsledky se shodují při vizuálním i spektrofotometrickém stanovení. Testy, jejichž výsledek nelze stanovit, je nutné zopakovat. Pokud jsou výsledky opakovaného testu pozitivní, je vzorek pozitivní. Pokud jsou výsledky opakovaného testu negativní, je vzorek negativní. Pokud opět nelze stanovit výsledky opakovaného testu, je nutné získat a testovat nový vzorek.

Poznámka: Výsledky stanovení všech jamek, jež jsou na pohled čiré, ale jejichž změřená hodnota optické hustoty neodpovídá vizuální interpretaci, je nutné považovat za rozporné a zkontrolovat, zda v jamkách nejsou bublinky, drobné částice nebo zda se v dolní části jamek nevytvořila neprůhledná vrstva. Odstraňte vrstvu tak, že otřete spodní strany jamek a znovu odečtete optickou hustotu. Jestliže rozpory mezi vizuálním stanovením a výsledky měření optické hustoty přetrvávají, opakujte test.

11. FUNKČNÍ OMEZENÍ TESTU

Platnost výsledků získaných pomocí stanovení ProSpecT *Campylobacter* na mikrotitračních destičkách závisí na průběhu kontrolních reakcí podle očekávání. Viz **Řízení jakosti**, část 9.

Negativní výsledek testu nevylučuje možnost přítomnosti *Campylobacteru* a může nastat, pokud je hladina antigenu ve vzorku nižší než detekční úroveň testu. Korelace mezi množstvím antigenu ve vzorku a klinickými projevy nebyla stanovena.

Stejně jako u všech diagnostických testů IN VITRO by výsledky testu měl interpretovat lékař s ohledem na klinický nález a/nebo další laboratorní výsledky.

Správný odběr a zpracování vzorků je nezbytné pro dosažení optimálního provedení stanovení. Optimální výsledky testu se získávají ze vzorků testovaných co nejdříve po odebrání vzorků. Viz též **Odběr vzorků stolice**, část 7.

Stanovení ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách nerozlišuje mezi *C. jejuni* a *C. coli* a existují další sérotypy a subspecie, které mohou nebo nemusí být detekovány. Není známo, zda *C. upsalensis*, *C. hyointestinalis* či *C. helveticus* reagují zkržně.

12. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Campylobacter jejuni je hlavní příčinou bakteriálního průjmu v USA a počet infekcí je nejvyšší v období od léta do podzimu⁵. Infekce je obvykle způsobena požitím kontaminovaného jídla nebo vody. Testováním vzorků komerčně zmrazené drůbeže byla zjištěna kontaminace od 30 do 90 %⁶. *C. jejuni* je všeobecně rozšířen v živočišné říši a byl izolován z řady domácích zvířat, drůbeže a prakticky z každého druhu volně žijících ptáků. Byl též zaznamenán přenos pohlavním stykem, fekálně orální cestou a pitím kontaminované povrchové vody⁵. Děti mladší 5 let a mladí dospělí (15 - 29 let) jsou infekcemi postiženi častěji než jiné věkové skupiny. Nedávná studie Společnosti amerických patologů (College of American Pathologists) 601 institucí zjistila, že bakteriální patogen mohl být identifikován v 6,4 % z 59 500 předložených vzorků⁷. *Campylobacter* byl zjištěn v 1,5 % vzorků, *Salmonella* v 1,15 % a *Shigella* v 0,9 % vzorků. Prevalence *C. jejuni* ve Spojených státech se pohybuje od 1,0 do 4,6 %³. Prevalence dosahující až 2,9 % byla též zjištěna ve čtyřleté studii prováděné ve Švýcarsku⁸.

13. PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY

CITLIVOST A SPECIFIČNOST

Stanovení ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách bylo hodnoceno na třech geograficky odlišných pracovištích ve Spojených státech a v Kanadě. Jednalo se o tato pracoviště: městská nemocnice v Illinois, velká referenční laboratoř v New Jersey a centralizovaná testovací laboratoř v Ontariu v Kanadě. Všechny vzorky byly testovány pomocí kultivačního vyšetření a biochemických stanovení, jejichž účelem bylo potvrdit pozitivní izolát *Campylobacteru*. Výsledky každého pracoviště, na němž byly testy provedeny, jsou po zopakování testů s nestanovitelnými výsledky a testů s rozpornými výsledky podle pokynů v tomto návodu k použití uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Stanovení ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách ve srovnání s kultivačním vyšetřením vzorků stolice.

PRACOVISŤE 1 VÝSLEDKY KULTIVAČNÍHO VYŠETŘENÍ

		+	-	
Stanovení ProSpecT	+	70	6	
na mikrotit.	-	0	337	
destičkách		70	343	413

Citlivost: 100 %

Specifičnost: 98,3 %

PRACOVISŤE 2 VÝSLEDKY KULTIVAČNÍHO VYŠETŘENÍ

		+	-	
Stanovení ProSpecT	+	10	0	
na mikrotit.	-	0	214	
destičkách		10	214	224

Citlivost: 100 %

Specifičnost: 100 %

PRACOVISŤE 3 VÝSLEDKY KULTIVAČNÍHO VYŠETŘENÍ

Stanovení ProSpecT na mikrotit. destičkách	+	49	2	
	-	0	361	
		49	363	412

Citlivost: 100 %
Specifičnost: 99,4 %

Tabulka 2: Výsledky s kombinovanými údaji ze tří pracovišť provádějících klinické hodnocení přímého rozboru vzorků stolice.

Přímý rozbor vzorků stolice

Stanovení ProSpecT na mikrotit. destičkách	+	129	8	
	-	0	912	
		129	920	1049

Citlivost: 100 % (97,2 - 100 %)
Specifičnost: 99,1 % (98,3 - 99,6 %)
Korelace: 99,2 % (98,5 - 99,7 %)

Jak je patrné z tabulky 2, když byly zkombinovány výsledky všech tří pracovišť a určeny výsledky všech rozporných stanovení a nestanovitelné výsledky, existovala mezi stanovením ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách a kultivačním vyšetřením 99,2 % korelace. Všechny výsledky rozporných stanovení EIA byly po opakovaném provedení testu určeny jako negativní. Existoval jeden vzorek, který byl původně při stanovení EIA pozitivní (EIA+) a při kultivačním vyšetření negativní (kultivace -). Po provedení opakovaného testu byl kultivační test pozitivní a bylo zjištěno, že vzorek je skutečně pozitivní. Ze zbývajících 8 vzorků, u nichž byl výsledek EIA+, kultivace-, byl při opakovaném testu jeden EIA negativní. Zbývajících 7 vzorků bylo opakovaně pozitivních.

Na 2. pracovišti provádějícím klinické hodnocení byly všechny vzorky testované v přímém rozboru stolice též pomnoženy přes noc v GN bujonu podle Hajna při teplotě 35 ± 2 °C a okolních atmosférických podmínkách. Pomnožená kultura byla poté testována stanovením ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách a porovnává se standardní metodikou kultivačního vyšetření stolice. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Stanovení ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách ve srovnání s kultivačním vyšetřením vzorků stolice pomnožených v bujonu.

PRACOVISŤE 2 VÝSLEDKY KULTIVAČNÍHO VYŠETŘENÍ

Stanovení ProSpecT na mikrotit. destičkách	+	9	0	
	-	1	214	
		10	214	224

Citlivost: 90,0 % (55,5 - 99,9 %)
Specifičnost: 100 % (98,3 - 100 %)
Korelace: 99,6 % (97,5 - 100 %)

Jak je patrné z tabulky 3, když byly vzorky pomnoženy v GN bujonu dle Hajna a byly určeny výsledky rozporných měření, existovala mezi stanovením ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách a kultivačním vyšetřením 99,6 % korelace. Všechny nestanovitelné výsledky a výsledky rozporných stanovení EIA byly po opakovaném provedení testu určeny jako negativní.

ANALYTICKÁ CITLIVOST

Stanovení ProSpecT na mikrotitračních destičkách detekuje specifický antigen *Campylobacteru* v množstvích přibližně 2,81 ng/ml a asi 10⁵ CFU/ml.

REPRODUKOVATELNOST

Variační koeficient (CV) mezi stanoveními neboli mezi jednotlivými sériemi měření testu ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách byl hodnocen výběrem jednoho negativního a tří pozitivních vzorků s různými naměřenými hodnotami optické hustoty. Každý vzorek byl testován v 22 - 24 jamkách/sérii měření ve třech po sobě jdoucích sériích měření. Střední hodnota variačního koeficientu mezi stanoveními byla 11,4 %.

Vzorek	Střední hodnota O.D.	Směrodatná odchylka	CV %
1	1,325	0,033	9,6 %
2	0,535	0,070	13,1 %
3	0,342	0,050	14,6 %
4	0,045	0,004	8,4 %

Variační koeficient (CV) v rámci stanovení neboli v rámci série měření byl hodnocen testováním 22 - 24 jamek pro každý ze 4 vzorků. Střední hodnota variačního koeficientu v rámci jednoho stanovení byla 4,0 %.

Vzorek	Střední hodnota O.D.	Směrodatná odchylka	CV %
1	1,268	0,033	2,61 %
2	0,501	0,015	2,95 %
3	0,320	0,009	2,84 %
4	0,047	0,004	7,70 %

ZKŘÍŽENÁ REAKTIVITA

Při testování řady organismů mikroflory lidského tračníku stanovením ProSpecT Campylobacter na mikrotitračních destičkách nebyla zjištěna zkřížená reaktivita. Testy byly provedeny naočkováním dále uvedených organismů do stolice pozitivní a negativní na Campylobacter jejuni. Bakterie byly naočkovány v koncentracích > 1 x 10⁷ CFU/ml stolice.

Arcobacter butzleri ATCC® 49616
Campylobacter curvis ATCC® 35224
Campylobacter fetus ATCC® 19438
Campylobacter lari ATCC® 35221
Campylobacter rectus ATCC® 33238
Campylobacter sputorum ATCC® 35980
Citrobacter braakii ATCC® 43162
Escherichia coli, EHEC, ATCC® 43890 (O157:H7)
Escherichia coli, EIEC, ATCC® 43893 (O124:NM)
Escherichia coli, EPEC, ATCC® 12014 (O55:NM)
Escherichia coli, EPEC, ATCC® 33780 (O111:NM)
Escherichia coli, ETEC/EPEC, ATCC® 43887 (O111:NM)
Escherichia coli, Stx negative, ATCC® 25922
Escherichia hermannii ATCC® 33660
Enterobacter cloacae ATCC® 13047
Enterococcus faecalis ATCC® 49149
Helicobacter cinaedi ATCC® 35683
Helicobacter pylori ATCC® 43504
Klebsiella pneumoniae ATCC® 27736
Proteus vulgaris ATCC® 33420
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853
Salmonella typhimurium SA 972229
Serratia liquefaciens ATCC® 27592
Shigella dysenteriae ATCC® 49347

Shigella flexneri ATCC® 25929
Shigella sonnei ATCC® 25931
Staphylococcus aureus ATCC® 25923
Yersinia enterocolitica ATCC® 23715

14. SEZNAM LITERATURY

- Guerrant, R.L. and D.A. Bobak. 1991.**
Review Article, Medical Progress, Bacterial and Protozoal Gastroenteritis. N. Engl. J. Med. 325(5): 327-340.
- Mitchell, J.E. and M.M. Skelton. 1988.**
Diarrhoeal Infections. Am. Fam. Phys. May 37(5): 195-207.
- Guerrant, R.L., et al. 1985.**
Evaluation and Diagnosis of Acute Infectious Diarrhoea. Am. J. Med. 78(6B): 91-98.
- Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, Campylobacter jejuni. 1992.**
Bad Bug Book, <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap4.htm>.
- Cohen, M.L., 1988.**
The Epidemiology of Diarrhoeal Disease in the United States Infectious Diarrhoea, Division of Bacterial Disease, CDC, 557-570.
- Gilligan, P.H., et al, April 1992.**
Laboratory Diagnosis of Bacterial Diarrhoea. ASM, Cumitech 12A: 8-10.
- Valenstein, P., et al, 1996.**
The Use and Abuse of Routine Stool Microbiology. Arch. Pathol. Lab. Med., 120: 206-211.
- Rohner, P., et al, 1997.**
Etiological Agents of Infectious Diarrhoea: Implications for Requests for Microbial Culture. J. Clin. Microbiol. 35(6): 1427-1432.
- Williams, E.K., 1986.**
Acute Infectious Diarrhoea. II. Diagnosis, Treatment and Prevention. Pediatr. Infect. Dis. 5(4): 458-465.

ProSpecT je registrovaná ochranná známka.

ATCC® je registrovaná ochranná známka organizace American Type Culture Collection.



Oxoid Ltd Wade Road Basingstoke Hants, RG24 8PW UK

Máte-li zájem o technickou asistenci, obraťte se laskavě na místního distributora.

IFU X7595A, Revidované prosince 2012