



# Serazym<sup>®</sup> Clostridium difficile Toxin A+B

Enzimski imunotest za kvalitativnu detekciju enterotoksina TcdA (toksin A) i citotoksina TcdB (toksin B) specifičnih za bakteriju *Clostridioides difficile* u uzorcima stolice ljudskog porijekla ili u suspenzijama kulture

<b>REF</b>	E-040		96
<b>IVD</b>	<i>In vitro</i> dijagnostički medicinski proizvod		



Seramun Diagnostica GmbH • Spreehagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •  
T +49 33767 791-10 • [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com) • [www.seramun.com](http://www.seramun.com)



In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Država proizvodnje i datum proizvodnje



Čuvati podalje od sunčeve svjetlosti



Pogledajte upute za uporabu



Dovoljno za sljedeći broj testiranja: *n*



Jedinstvena identifikacija proizvoda



Broj artikla



Ograničenje vlažnosti



Ograničenje temperature



Biološka opasnost



Proizvođač



Serijski broj



Šifra serije



Nemojte ponovno upotrebljavati



Rok valjanosti



Pažnja

## Predviđena uporaba

Serazym® *Clostridium difficile* Toxin A+B je in vitro dijagnostički (IVD) test za kvalitativno određivanje enterotoksina TcdA (toksin A) i citotoksina TcdB (toksin B) bakterije *Clostridioides* (prethodni naziv: *Clostridium*) *difficile* u uzorcima stolice ljudskog porijekla za ručnu ili poluautomatiziranu obradu od strane stručnog osoblja u laboratoriju.

Namijenjen je kao pomoć pri dijagnosticiranju infekcije bakterijom *C. difficile* (CDI) u uzorcima od pacijenata sa simptomima gastroenteritisa povezanog s bakterijom *C. difficile*.

## Načelo testa

Serazym® *Clostridium difficile* Toxin A+B enzimski je imunotest koji se temelji na monoklonskim protutijelima protiv toksina A i B bakterije *Clostridioides* (prethodni naziv: *Clostridium*) *difficile*. Razrijeđeni, netretirani uzorci stolice ili suspenzija kulture, kao i negativni i pozitivni kontrolni uzroci, doziraju se u jažice mikrotitracijske ploče obložene monoklonskim protutijelima protiv toksina A i toksina B. Nakon inkubacije nevezane komponente uklanjaju se u koraku ispiranja, te se zatim biotinom obilježena monoklonska protutijela protiv toksina A i B doziraju u jažice. Nakon inkubacije nevezane komponente uklanjaju se u koraku ispiranja. Biotinom obilježena vezana protutijela reagiraju sa streptavidinom konjugiranim peroksidazom iz hrena (engl. horseradish peroxidase, HRP) u daljnjem koraku inkubacije. Nakon koraka inkubacije i koraka ispiranja HRP pretvara bezbojnu otopinu supstrata u plavi reakcijski produkt u sljedećem koraku enzimske reakcije. Reakcija se zaustavlja dodavanjem otopine za zaustavljanje reakcije, uslijed čega dolazi do promjene boje iz plave u žutu. Optička gustoća (engl. optical density, OD) reakcijskog produkta, koja se mjeri s pomoću mjernog filtra od 450 nm te referentnog filtra od  $\geq 620$  nm, izravno je proporcionalna koncentraciji specifično vezanih antigena toksina A i B bakterije *C. difficile*.

## Komponente testa (opseg isporuke)

		Za 96 jažica	
1	<b>WELLS</b>	<b>Mikrotitracijska ploča</b> obložena < 5 µg/mL monoklonskim (mišjim) protutijelima protiv toksina A i toksina B	12 lomljivih pojedinačnih traka s 8 jažica, oznaka u crvenoj boji, s vakuuskom brtvom i sredstvom za sušenje
2	<b>WASHBUF (10x)</b>	<b>Pufer za ispiranje (10 x)</b> Seramun® Wash buffer A, pufer na bazi TRIS-a	100 mL koncentrata za otopinu od 1000 mL, bezbojan bijeli čep
3	<b>DIL</b>	<b>Razrjeđivač za uzorak</b> Seramun® Sample diluent A, pufer na bazi fosfata	100 mL, spreman za uporabu, žute boje, crni čep
4	<b>CONTROL +</b>	<b>pozitivna kontrola</b> < 5 µg/mL rekombinantnog antigena <i>C. difficile</i>	2,0 mL, spreman za uporabu, plave boje, crveni čep
5	<b>CONTROL -</b>	<b>Negativna kontrola</b> pufer na bazi TRIS-a	2,0 mL, spreman za uporabu, plave boje, zeleni čep
6/1	<b>CONJ BIOTIN</b>	<b>Konjugat biotina</b> < 1 µg/mL biotinom obilježena monoklonska (mišja) protutijela protiv toksina A i toksina B	15 mL, spreman za uporabu, zelene boje, bijeli čep
6/2	<b>CONJ STREPT</b>	<b>Konjugat streptavidin-HRP</b> < 1µg/mL	15 mL, spreman za uporabu, crvene boje, zeleni čep

7	<b>SUBSTR</b>	<b>Supstrat</b> SeramunBlau® automat fast, < 0,1 % 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina; < 0,05 % vodikova peroksida	15 mL, spreman za uporabu, bezbojan, plavi čep
8	<b>STOP</b>	<b>Otopina za zaustavljanje reakcije</b> SeramunBlau® stop, 0,25 M sumporne kiseline	15 mL, spreman za uporabu, bezbojan, žuti čep
9		<b>Potvrda o analizi</b>	1 komad
10		<b>Upute za uporabu</b>	1 komad

## Dodatni materijali i pomagala potrebna za postupak testiranja

Podesiva jednokanalna mikropipeta • 8-kanalna mikropipeta ili višekanalna mikropipeta s vrhovima za pipete • Spremnici za reagense za doziranje s višekanalnom mikropipetom • 8-kanalni česalj za ispiranje s vakuumskom pumpom i bočicom za otpad ili alatom za pranje mikroploče • čitač mikroploče s mjernim filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od  $\geq 620$  nm • deionizirana voda • menzura • epruvete za pripremu uzoraka • orbitalna tresilica za postupak testa s tresilicom

## Važne informacije



**Ovaj je proizvod namijenjen isključivo za *in vitro* dijagnostičku uporabu.** Pažljivo slijedite upute. Komplet sastavnih dijelova smiju upotrebljavati samo zdravstveni djelatnici.

Nemojte upotrebljavati reagense iz oštećenih pakiranja ili bočica. Pridržavajte se navedenog roka trajanja. Nemojte miješati komponente s reagensima drugih proizvođača.

**Miješanje komponenata kompleta sastavnih dijelova za test različitih serija dopušteno je samo za pufer za ispiranje (10 x), razrjeđivač za uzorak, negativna kontrola, supstrat i otopinu za zaustavljanje reakcije.**

**Pufer za ispiranje (10 x), razrjeđivač za uzorak, negativna kontrola, supstrat i otopina za zaustavljanje reakcije univerzalno su primjenjivi za Serazym® stool ELISA Adenovirus (E-017), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Rotavirus (E-020), Campylobacter (E-093), Clostridium difficile GDH (E-107), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Cryptosporidium parvum (E-039), Entamoeba histolytica (E-018), Giardia (E-106) i H. pylori 2nd Gen. (E-114).**

Svi ozbiljni štetni događaji koji se dogode u vezi s testom Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B moraju se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice EU-a u kojoj se korisnik i/ili pacijent nalazi.

## Informacije o postupku testa

Svi reagensi moraju se čuvati na temperaturi od 2...8 °C. Prije uporabe pustite da sve komponente testa dosegnu sobnu temperaturu. Reagensi za koje se čini da su kontaminirani ne smiju se upotrebljavati.

Svaka jažica mikrotitracijske ploče smije se upotrebljavati samo jednom. Svaki uzorak i kontrola moraju se pipetirati novim vrhom pipete. Pozitivne i negativne kontrole spremne su za uporabu.

U slučaju većih serija uzoraka preporučuje se pipetirati reagente iz spremnika za tekućinu s pomoću višekanalnih mikropipeta kako bi se izbjegle vremenske odgode i kontaminacija. Pridržavajte se rasporeda pipetiranja i vremenskog slijeda protokola.

Koraci aspiracije i ispiranja mogu se izvršiti ručno ili s pomoću alata za pranje mikroploča ili pumpe za ispiranje. Otopinu za ispiranje treba ostaviti da postigne minimalno vrijeme reakcije od 5 s u jažicama po ciklusu ispiranja. Uklonite ostatke pufera temeljitom aspiracijom ili tapkanjem jažica!

Zaštitite supstrat od svjetla!

## Sigurnosne upute


Reagensi se ne smiju progutati te se mora izbjegavati kontakt s kožom i sluznicama.

Rukujte svim komponentama i uzorcima pacijenata kao da se radi o potencijalno opasnom i infektivnom materijalu.

Dodatne informacije mogu se pronaći u sigurnosno-tehničkom listu.

Proizvod sadržava sljedeće opasne komponente:

Komponenta testa	Označavanje opasnih tvari i dodatne informacije o sastojcima
<b>WELLS</b>	Sadržava materijal životinjskog porijekla.
<b>WASHBUF (10x)</b>	EUH208: Sadrži reakcijska smjesa 5-klor-2-metil-2H-izotiazol-3-ona i 2-metil-2H-izotiazol-3-ona (3: 1). Može izazvati alergijsku reakciju. EUH210: Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtjev. Konzervansi: < 0,0015 %-tna reakcijska smjesa 5-kloro-2-metil-2H-izotiazol-3-ona i 2-metil-2H-izotiazol-3-ona (3 : 1); < 0,1 %-tni 5-bromo-5-nitro-1,3-dioksan
<b>DIL</b>	Sadržava materijal životinjskog porijekla. Konzervansi: < 0,1 % natrijeva azida
<b>CONTROL +</b>	Sadržava materijal mikrobnog i životinjskog porijekla. Konzervansi: < 0,1 % natrijeva azida
<b>CONTROL -</b>	Sadržava materijal životinjskog porijekla. Konzervansi: < 0,01 % natrijeva azida
<b>CONJ BIOTIN</b>	EUH208: Sadrži reakcijska smjesa 5-klor-2-metil-2H-izotiazol-3-ona i 2-metil-2H-izotiazol-3-ona (3: 1). Može izazvati alergijsku reakciju. EUH210: Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtjev. Sadržava materijal mikrobnog i životinjskog porijekla. Konzervansi: < 0,0015 %-tna reakcijska smjesa 5-kloro-2-metil-2H-izotiazol-3-ona i 2-metil-2H-izotiazol-3-ona (3 : 1); < 0,1 %-tni 5-bromo-5-nitro-1,3-dioksan
<b>CONJ STREPT</b>	EUH210: Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtjev. Sadržava materijal životinjskog porijekla. Konzervansi: < 0,00015 %-tna reakcijska smjesa 5-kloro-2-metil-2H-izotiazol-3-ona i 2-metil-2H-izotiazol-3-ona (3 : 1); < 0,1 %-tni 5-bromo-5-nitro-1,3-dioksan

Komponenta testa	Označavanje opasnih tvari i dodatne informacije o sastojcima
<b>SUBSTR</b>	<p>Opasna komponenta: 2-pirolidon</p> <p>Signalna riječ: Opasnost</p>  <p>H360: može štetno djelovati na plodnost ili naškoditi nerođenom djetetu.</p> <p>P201: prije uporabe pribaviti posebne upute.</p> <p>P280: nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.</p> <p>P308+P313: U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: zatražiti savjet/pomoć liječnika.</p> <p>Samo za profesionalne korisnike.</p> <p>Konzervansi: &lt; 0,00015 %-tna reakcijska smjesa 5-kloro-2-metil-2H-izotiazol-3-ona i 2-metil-2H-izotiazol-3-ona (3 : 1)</p>
<b>STOP</b>	-

### Ograničenja postupka

Kvalitativna enzimska imunološka detekcija toksina A i B bakterije *Clostridioides difficile* u uzorcima stolice ne omogućuje korelaciju između izmjerenog OD-a i ozbiljnosti infekcije. Korelacija između apsorbancije uzoraka i apsorbancije pozitivne kontrole također nije dopuštena. Uslijed križne kontaminacije reagensa i uzoraka može doći do lažnih rezultata. Nepravilno razrjeđivanje, nedovoljno homogenizirani uzorci i čestice koje nisu sedimentirane centrifugiranjem mogu uzrokovati koliko lažno pozitivne, toliko i lažno negativne rezultate testa. Uzorci tretirani formalinom mogu uzrokovati lažno pozitivne rezultate i stoga se ne smiju upotrebljavati u testu. Negativan rezultat testa dobiven testom Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B ne isključuje infekciju. Do lažno negativnih rezultata testiranja može doći uslijed nepravilnog vremenskog rasporeda prikupljanja uzorka ili nehomogene distribucije antigena u uzorku. Za ukupno tumačenje rezultata testa ELISA mora se uzeti u obzir potpuna klinička slika. Za pojedinačne slučajeve može biti potrebno ponovno testiranje u vremenskim intervalima od nekoliko tjedana.

## Obrada uzorka

### Prikupljanje uzorka

Prikupite uzorak stolice u prikladan spremnik za uzorkovanje.

Primjer: epruveta za stolicu s žličicom i navojnim čepom (107 x 25 mm), prozirna

### Rok valjanosti i pohrana uzorka

Uzorci stolice trebaju se pohraniti na 2...8 °C ili na -20 °C odmah nakon prikupljanja i pregledati u roku od 72 sata. Ponovljeno zamrzavanje (> 3 x) i odmrzavanje uzoraka moraju se izbjegavati zbog rizika od netočnih rezultata. Uzorci stolice koji su već razrijeđeni u razrjeđivaču za uzorke Seramun® Sample diluent A u skladu s uputama za uporabu mogu se pohraniti na 2...8 °C do 72 h i nakon toga analizirati testom ELISA.

### Priprema uzorka

Dobro promiješajte netretirane uzorke stolice i razrijedite ih puferom za uzorke u omjeru 1 : 6. Primjer: Pipetirajte 500 µL pufera za uzorke u reakcijsku epruvetu. Ako su uzorci stolice kruti ili polukruti, prenesite 100 mg (promjera otprilike 2–3 mm) štapićem za jednokratnu uporabu; ako su uzorci stolice tekući, prenesite 100 µL u pufer za uzorke i dobro promiješajte. Po potrebi sedimentirajte suspendirane čestice centrifugiranjem u mikrocentrifugi tijekom 1 min pri najvećoj brzini.

## Obrada reagensa

### Rok valjanosti i pohrana reagensa

Potpuni komplet sastavnih dijelova testa sa zabrtvljenim bočicama reagensa i mikrotitracijskim trakama može se pohraniti na 2...8 °C do otisnutog roka valjanosti. Sve otvorene komponente kompleta sastavnih dijelova testa stabilne su do 2 mjeseca ako se do 2 mjeseca ako se pravilno pohrane na 2 - 8 °C. Razrijeđeni pufer za ispiranje može se čuvati na 2...8 °C do 1 mjeseca.

### Priprema reagensa

Mikrotitracijska ploča s lomljivim trakama s 8 jažica, vakuumskom brtvom i sredstvom za sušenje. Prije otvaranja pustite da pakiranje dosegne sobnu temperaturu. Zaštitite neupotrijebljene jažice od vlage i pohranite ih u hladnjak s pažljivo ponovno zabrtvljenim sredstvom za sušenje u originalnoj vrećici. Razrijedite pufer za ispiranje (10 x) u omjeru 1 : 10 deioniziranom vodom. Primjer: 10 mL Seramun® Wash buffer A (10 x) + 90 mL deionizirane vode.

## Postupak testa

1. Pustite da reagensi testa i potreban broj jažica dosegnu sobnu temperaturu (engl. room temperature, RT). Prije uporabe lagano protresite reagente. Nemojte dopustiti da se zapjene.
2. Pipetirajte 100 µL **CONTROL +** pozitivne kontrole  
100 µL **CONTROL -** negativne kontrole  
100 µL razrijeđenog uzorka stolice ili suspenzije kulture.
3. Pokrijte ploču i inkubirajte tijekom 60 min na RT-u.
4. Procijedite te zatim operite svaku jažicu 5 x s 300 µL razrijeđenog pufera za ispiranje. Po potrebi osušite upijajućim papirom.
5. 120 µL **CONJ BIOTIN** konjugata biotina po jažici.
6. Pokrijte ploču i inkubirajte tijekom 30 min na RT-u.
7. Procijedite te zatim operite svaku jažicu 5 x s 300 µL razrijeđenog pufera za ispiranje. Po potrebi osušite upijajućim papirom.
8. 120 µL **CONJ STREPT** konjugata streptavidin-HRP po jažici.
9. Pokrijte ploču i inkubirajte tijekom 30 min na RT-u.
10. Procijedite te zatim operite svaku jažicu 5 x s 300 µL razrijeđenog pufera za ispiranje. Po potrebi osušite upijajućim papirom.
11. 120 µL **SUBSTR** supstrata po jažici.
12. Inkubirajte 15 min na RT-u **uz zaštitu od svjetlosti**.
13. 120 µL **STOP** otopine za zaustavljanje reakcije po jažici, lagano promiješajte.
14. Izmjerite OD s pomoću mjernog filtra od 450 nm i referentnog filtra od ≥ 620 nm koristeći čitač mikroploča u roku od 30 min nakon zaustavljanja reakcije.

## Procjena rezultata

### Kvalitativna evaluacija

Određivanje granične vrijednosti: OD negativne kontrole +0,20

Uzorci koji pokazuju vrijednosti OD-a koje su jednake graničnoj vrijednosti ili više od nje smatraju se pozitivnima, dok se uzorci s vrijednostima OD-a koje su za 10 % niže od granične vrijednosti smatraju negativnima za antigene toksina A i B bakterije *C. difficile*. Uzorci koji pokazuju vrijednosti OD-a unutar 10 % ispod granične vrijednosti te uzorci s vrijednostima jednakima graničnoj vrijednosti smatraju se graničnima i moraju se testirati ponovno. U slučaju da se više puta ponovi granični rezultat, potrebno je analizirati drugi uzorak stolice tog pacijenta.

Testiranje je valjano ako je:

- srednji OD negativne kontrole  $\leq 0,20$  (ručna obrada)  
 $\leq 0,30$  (automatska obrada)
- srednji OD pozitivne kontrole  $\geq 1,00$

Ako se ne ispune prethodno navedeni kriteriji kvalitete, test se mora ponoviti uz strogo pridržavanje postupka testa (vremena i temperature inkubacije, razrjeđivanje uzorka i pufera za ispiranje, koraci ispiranja itd.). U slučaju ponovljenog neispunjavanja kriterija kvalitete obratite se proizvođaču.

## Tumačenje rezultata

Pozitivan	$\geq$ graničnoj vrijednosti
Graničan	$0,9 \times$ granična vrijednost - granična vrijednost
Negativan	$<$ granične vrijednosti

Preporučuje se da svaki laboratorij ustanovi svoje normalne i patološke referentne rasponne.

## Karakteristike učinkovitosti

### Preciznost

Kako bi se odredila preciznost, 3 uzorka stolice izmjerena su više puta. Radi utvrđivanja koeficijenta varijacije (engl. coefficient of variation, CV) unutar testa uzorci su mjereni u osmerostrukom određivanju u jednom testiranju.

Utvrđivanje koeficijenta varijacije među testovima izvršeno je osmerostrukim određivanjem tijekom 2 dana u 5 različitih testiranja.

Uzorak	Koeficijent varijacije unutar testa		Koeficijent varijacije među testovima	
	$\bar{x}$ OD	CV (%)	$\bar{x}$ OD	CV (%)
1	1,386	3,0	1,321	7,7
2	0,506	3,3	0,485	6,9
3	0,332	8,5	0,345	10,8

### Osjetljivost i specifičnost

Osjetljivost i specifičnost testa Serazym® *Clostridium difficile* Toxin A+B utvrđene su u retrospektivnom ispitivanju sa 154 uzoraka stolice u usporedbi s komercijalno dostupnim testom ELISA.

n = 154	ELISA pozitivan	ELISA negativan
Serazym® ELISA pozitivan	103	4
Serazym® ELISA negativan	2	45

Osjetljivost: 98,1 %

Specifičnost: 91,8 %

## Križna reaktivnost

Uzorci stolice pozitivni na jedan od sljedećih patogena nisu pokazali križnu reakciju s testom Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B:

*Aeromonas caviae*; *Aeromonas hydrophila*; *Campylobacter spec.*; enterohemoragična *Escherichia (E.) coli* (EHEC); *Hafnia alvei*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.*; *Salmonella typhimurium*; *Staphylococcus aureus*, negativna na enterotoksin; *Staphylococcus aureus*, pozitivna na enterotoksin; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negativne suspenzije stolice dopunjene su sljedećim mikroorganizmima s brojem bakterija  $\geq 10^8$  jedinica koje tvore kolonije po mL u puferu za uzorke i imale su negativan rezultat na testu Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B (mjerni filtar od 450 nm i referentni filtar od  $\geq 620$  nm < granične vrijednosti):

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

Testirani soj ATCC 9714 bakterije *Clostridium sordellii* (ATCC 9714) nije pokazao križnu reaktivnost na testu Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B iako je u nekoliko publikacija opisana križna reaktivnost toksina sojeva bakterije *C. sordellii* s protutijelima protiv toksina bakterije *C. difficile*.

## Primjena

### Detekcija antigena iz suspenzija kultura

Kolonije bakterije *Clostridioides difficile* uzgojene na krvnom agaru ili cikloserin-cefoksitin fruktoznom agaru (CCFA) tijekom 48 h mogu se testirati izravno testom Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B. Pripremite bakterijsku suspenziju u skladu s McFarlandovim standardom 1 (vrijednost OD-a pri 600 nm = 0,20 - 0,25 nakon nulte kompenzacije razrjeđivačem za uzorak Serazym® Sample diluent A): Pipetirajte 1000 µL razrjeđivača za uzorak u epruvetu. Prenesite 2 - 4 inokulacijske petlje kolonije bakterije *C. difficile* u razrjeđivač za uzorak i izvršite ponovnu suspenziju u vrtložnoj miješalici. Po potrebi pročitajte vrijednost OD-a pri 600 nm kako je prethodno opisano.

100 µL se mora uzeti za testiranje testom ELISA. Ako se upotrebljavaju selektivne kulture medija, količina toksina koji se mogu otkriti može biti smanjena zbog inhibitornih komponenti tih medija, zbog čega može doći do smanjenih vrijednosti OD-a na testu ELISA (u usporedbi s potpunim medijem). Stoga je za uporabu selektivnih medija za kulturu toksina potrebno izvršiti minimalno pripremu bakterijske suspenzije u skladu s McFarlandovim standardom 4 (OD 600 nm > 1,0 nakon nulte kompenzacije razrjeđivačem za uzorak Serazym® Sample diluent A). U tom slučaju moraju se upotrijebiti kolonije bakterije *C. difficile* s barem polovice gusto prekrivene ploče agara. Po potrebi se moraju slijediti preporuke i informacije proizvođača medija, koji mogu navesti informacije o učinku aditiva koji se upotrebljavaju u određenim medijima na proizvodnji toksina i stoga na opću prikladnost medija za kulture toksina.

## Postupak testa s tresilicom

1. Pustite da reagensi testa i potreban broj jažica dosegnu sobnu temperaturu (engl. room temperature, RT). Prije uporabe lagano protresite reagense. Nemojte dopustiti da se zapjene.
2. Pipetirajte 100  $\mu$ L **CONTROL +** pozitivne kontrole  
100  $\mu$ L **CONTROL -** negativne kontrole  
100  $\mu$ L razrijeđenog uzorka stolice ili suspenzije kulture.
3. Pokrijte ploču i inkubirajte tijekom 30 min na RT-u na orbitalnoj tresilici s frekvencijom od 500 - 700 okr./min.
4. Procijedite te zatim operite svaku jažicu 5 x s 300  $\mu$ L razrijeđenog pufera za ispiranje. Po potrebi osušite upijajućim papirom.
5. 120  $\mu$ L **CONJ BIOTIN** konjugata biotina po jažici.
6. Pokrijte ploču i inkubirajte tijekom 15 min na RT-u na orbitalnoj tresilici s frekvencijom od 500 - 700 okr./min.
7. Procijedite te zatim operite svaku jažicu 5 x s 300  $\mu$ L razrijeđenog pufera za ispiranje. Po potrebi osušite upijajućim papirom.
8. 120  $\mu$ L **CONJ STREPT** konjugata streptavidin-HRP po jažici.
9. Pokrijte ploču i inkubirajte tijekom 15 min na RT-u na orbitalnoj tresilici s frekvencijom od 500 - 700 okr./min.
10. Procijedite te zatim operite svaku jažicu 5 x s 300  $\mu$ L razrijeđenog pufera za ispiranje. Po potrebi osušite upijajućim papirom.
11. 120  $\mu$ L **SUBSTR** supstrata po jažici.
12. Inkubirajte 15 min na RT-u bez tresenja **uz zaštitu od svjetlosti**.
13. 120  $\mu$ L **STOP** otopine za zaustavljanje reakcije po jažici, lagano promiješajte.
14. Izmjerite OD s pomoću mjernog filtra od 450 nm i referentnog filtra od  $\geq$  620 nm koristeći čitač mikroplača u roku od 30 min nakon zaustavljanja reakcije.

## Automatska obrada

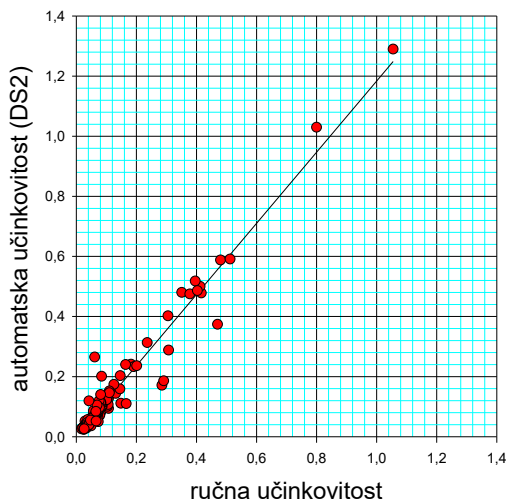
Na korisniku je odgovornost da prije uporabe ovog proizvoda validira mikrotitarske automatske uređaje i pripadajuće aplikacijske datoteke. Za pripadajuće aplikacijske datoteke za uporabu dolje navedenih mikrotitarskih automatskih uređaja može se kontaktirati lokalni distributer.

Izvođenje testa Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B na potpuno automatiziranim procesorima mikroplača (npr. DS2®, DSX®, Dynex Technologies) može uzrokovati povišene vrijednosti apsorbancije u usporedbi s ručnim postupkom zbog razlika u postupcima ispiranja i tehničkim specifikacijama opreme. U tim slučajevima maksimalna vrijednost OD = 0,3 dopuštena je za negativnu kontrolu. Preporučuje se programirati protokol ispiranja uz vrijeme namakanja od 10 s po traci i koraku ispiranja. Nakon svakog ciklusa ispiranja preporučuje se provesti korak završnog ispiranja deioniziranom vodom uz vrijeme namakanja od 10 s. Po potrebi se broj koraka za ispiranje može povećati na 7 x ili 8 x.

## Korelacija: ručna - automatska obrada

Panel od 125 uzoraka stolice obrađen je usporedno ručno i automatski (DS2®, Dynex Technologies). Koeficijent korelacije izračunat je kao  $r = 0,976$ .

### Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B



### Povijest izmjena

Verzija	Dio	Izmjene
2026-05	Naslovna stranica	Prilagodba broja artikla konceptu pakiranja
	Komponente testa (sadržaj isporuke)	Prilagodba volumena konceptu pakiranja, dopuna količine ili koncentracije aktivne komponente
	Dodatni materijali i pomagala potrebni za izvođenje testa	Dopuna „spremnici za reagense za doziranje pomoću multikanalne mikropipete”
	Važne napomene	Uključivanje negativne kontrole kao lot- i proizvodno-nezavisne komponente; tablica pod „Sigurnosne napomene” prilagođena označavanju na etiketi
	Obrada uzoraka	Dopuna primjera spremnika za uzorke
	Izvođenje testa	Prilagodba konceptu pakiranja
	Primjena: automatska obrada	Uključivanje odgovornosti korisnika za validaciju automatskih uređaja za mikrotitarske ploče
Obrada reagensa	Prijevod za washing buffer je korigiran.	