

immunocard STAT!

C. difficile GDH-AB

Rapid one-step Immunoassay for the Simultaneous Detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase Antigen (GDH) and Toxins A and B in human Stool

REF 750520

IVD

INTENDED USE

Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB is a rapid, qualitative, immunochromatographic assay for the simultaneous detection, in human stool, of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase antigen (GDH, also called "common antigen") and *Clostridium difficile* Toxins A and B. This assay is used as an aid in the diagnosis of C. difficile-associated disease and results should be used by the clinician in conjunction with clinical picture, other laboratory findings and epidemiological risk factors.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Clostridium difficile is a spore-forming, gram-positive, anaerobic bacterium that can be present asymptomatically in up to 5% of the healthy population¹. Toxigenic strains of *Clostridium difficile* represent the leading cause of nosocomial infectious diarrhea in developed countries, also representing the etiologic agent in approximately 25% of all cases of antibiotic-associated diarrhea². An estimated 300,000 cases of C. difficile infections (CDAD) are seen per year in U.S. hospitals alone.^{1, 2} Virtually any antibiotic can predispose a patient to CDAD. The clinical picture for CDAD ranges from asymptomatic colonization to life-threatening pseudomembranous colitis and toxic megacolon.² The pathogenic strains of C. difficile produce at least one of two biologically and immunologically distinct toxins³: toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin), which are the main virulence factors responsible for the clinical signs of the disease.

Glutamate dehydrogenase (GDH), is an enzyme produced in large quantities by toxigenic and non-toxigenic strains of C. difficile, thus making it an excellent marker for determining the presence of this microorganism itself⁴.

The Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) recommend different testing approaches for the laboratory detection of toxigenic C. difficile⁵, including different combinations of GDH, toxins and NAAT assays. One of the suggested testing algorithms consists in the use of a two-step protocol, involving an initial screening of the sample with a GDH test and, if the result is positive, use of a second test to confirm the toxigenicity of the strain, as only the toxigenic and pathologic strains of this microorganism produce them. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB enables a lab to adopt this approach, obtaining the two results simultaneously with a single-step assay.

A positive result in the test for the glutamate dehydrogenase of C. difficile confirms the presence of this organism in a fecal specimen; a negative result indicates the absence of the organism. A positive result in the test for toxins A and/or B confirms the presence of toxigenic C. difficile.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The test Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB contains two strips placed in a double cassette, one for GDH and one for Toxins A & B:

1. GDH strip uses a combination of:
 - a. Pink-Red latex particles conjugated to specific antibodies against C. difficile GDH and GDH specific antibodies immobilized in the Test Position, below the Control Band. During incubation, if GDH antigen is present, is bound to both the antibodies, developing a pink-red line at Test Position.
 - b. Blue latex particles conjugated to an antigen recognized by a specific antibody for this antigen, bound to the membrane, defining the Control Band of the test.
2. TOXINS strip uses a combination of:
 - a. Pink-Red latex particles conjugated to specific antibodies against toxin B and antibodies specific for toxin B immobilized in B Position, below the Control Band. During incubation, if Toxin B is present, is bound to both the antibodies, developing a pink-red line at B Position.
 - b. Pink-Red latex particles conjugated to specific antibodies against toxin A and antibodies specific for toxin A immobilized in A position, below the toxin B band. During incubation, if Toxin A is present, is bound to both the antibodies, developing a pink-red line at A Position.
 - c. Blue latex particles conjugated to an antigen recognized by a specific antibody for this antigen, bound to the membrane, defining the Control band of the test.

A diluted patient stool sample is dispensed into both sample ports of the cassette and migrates along the membranes through the Test and Control zones. After 15 minutes of incubation at room temperature, the appearance of a specific colored line in the reading window next to the corresponding letter indicates a positive result in the presence of the Control line (see Fig. 1).

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this kit is listed on the outer box.

1. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB device: Two reactive strips housed in a plastic frame and enclosed in a foil pouch with a desiccant.
2. Sample Diluent vials: Buffered solution containing 0.095% of sodium azide as preservative. The diluent is supplied in a single use plastic dropper vial with an applicator stick. Use as supplied.
3. Disposable Transfer pipettes

MATERIALS NOT PROVIDED

1. External Control Set with Positive and Negative Controls. Meridian Cat. No 750501
2. Vortex
3. Interval Timer

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not deviate from the method described here or falsely positive or falsely negative results may occur. Once the assay has started, complete all subsequent steps without interruption.

- Patient specimen and used Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB device may contain infectious agents and should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
- Do not interchange reagents from different kit lot numbers and do not use expired reagents.
- Do not use the sample dilution buffer if there is evidence of contamination or precipitation.
- The sample dilution buffer contains sodium azide which is a skin irritant. Avoid skin contact with reagents. Disposal of reagents containing sodium azide into lead or copper plumbing can result in the formation of explosive metal azides. This can be avoided by flushing with a large volume of water during such disposal.
- Correct stool storage and correct stool dilution are essential to ensure correct results. Over-inoculation of stool into the Sample Diluent may restrict the flow within the Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB device, determining invalid results. Incorrect stool storage or under-inoculation into the Sample Diluent may determine false negative results.
- In case the primary packaging is damaged (foil pouch or diluent buffer vial) the product should be discarded and not used.
- Do not use this product if a colored line appears in the result area of any strip before you start to use it.
- If the test is stored refrigerated, allow all the kit components and faecal samples reach room temperature, because cold reagents and/or samples can reduce test functionality.
- Do not discard the kit box until all the content has been used. This box contains essential information about the CE mark of the product and the batch number.
- The used product should be discarded in compliance with current local laws

HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

Store the Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB kit at 2-30 C when not in use. The kit expiration date is indicated on the kit label.

PROCEDURAL NOTES

- Allow kit components and specimens to reach room temperature (19-27 C) before performing a test, as cold reagents and/or specimens may decrease assay sensitivity. Reagents may take up to 60 minutes to warm up following refrigeration.
- Stool samples must be mixed thoroughly (regardless of consistency) prior to sampling to ensure a representative sample.
- Hold reagent vials vertically when dispensing drops to ensure consistent drop size and delivery.
- On occasion, particulate matter may interfere with sample flow. In cases when the Test Device does not readily absorb the diluted specimen, gently touch the bottom of the sample port with an applicator stick, moving the stool solid particle that might prevent the absorption. Alternatively, a new aliquot of the sample can be withdrawn from the Diluent and retested. Diluted samples containing a heavy concentration of particulate matter may be centrifuged (1-5 minutes at 700 x G) or allowed to stand for 3-5 minutes before proceeding.
- Ensure to take the appropriate amount of sample: about 110 mg for solid samples (a small portion of about 5 mm diameter). If the sample is semi-liquid (unable to take it with a pipette) take an amount adequate of covering the grooves of the stick attached to the vial cap. If the sample is liquid, collect 110 µL (4 drops if the disposable pipettes provided with the kit are used). These amounts are extracted into the sample dilution buffer supplied in the vials included in the kit. An excess of sample in relation to the previously indicated may prevent the chromatography from running correctly; this is especially critical with solid samples since it is not easy to take the recommended amount of sample.
- Ensure to add the correct volume of the extracted sample to the two sample ports marked with an arrow in the plastic device. If the volume is lower than indicated, the flow may not occur due to insufficient sample reaching the reaction strips; if the volume is higher, brown lines may appear instead of the expected ones (see Fig. 1).

REAGENT PREPARATION

Reagents are supplied ready to use. Allow kit components and specimens to reach room temperature (19-27 C) prior to use. Gently mix liquid reagent prior to use. Open the device pouch only when ready to run the assay.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The test is validated for fresh untreated samples. Do not use samples collected in transport media, or those with added preservative agents (such as formalin, SAF, PVA or similar) or enrichment media, as their presence could interfere with correct performance of the test.

Stool samples should be transported in an airtight container. The sample should be tested as soon as possible but may be held up to 2 days at 2-8 C prior to testing. If testing cannot be performed within this timeframe, samples should be frozen immediately upon receipt and stored frozen (-20 C) until tested. Samples may be frozen and thawed twice. Ensure the samples have reached room temperature before testing.

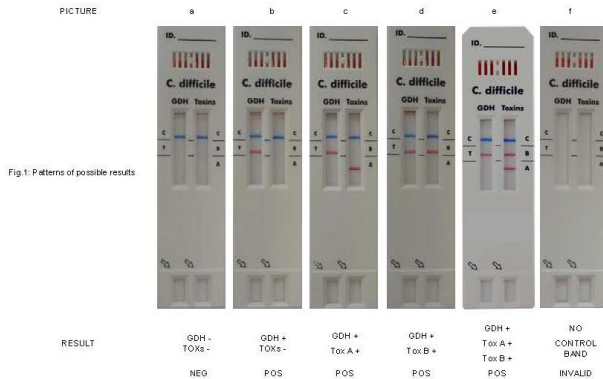
TEST PROCEDURE

Bring all test cards, sample diluents and samples to room temperature (19-27 C) before testing. Remove the reagents from the kit box to warm. Reagents may take up to 60 minutes to warm following refrigeration.

- Label one Sample Diluent Vial for each patient sample to be tested.
- Unscrew the cap from the vial with caution in order not to spill the sample diluent buffer.
- Immediately add stool sample or controls as follows:
 - Formed/Solid stools – Mix the stool sample thoroughly. Using the stick attached to the vial cap, collect a small portion of 5 mm diameter.
 - Semi-solid stools - Mix the stool sample thoroughly. Using the stick attached to the vial cap, collect a sample amount that completely covers the grooves of the stick.
 - Liquid Stools - Using the disposable pipettes provided in the kit, mix the stool sample thoroughly, collect and dispense in the vial 4 drops of stool (corresponding to a volume of a 110 µL).
 - External Positive or Negative Control: refer to EXTERNAL CONTROL SET Instructions for Use.
- Carefully add the sample into the corresponding vial containing the dilution buffer. Screw the cap firmly and shake it vigorously to ensure mixture homogenization.
- Use 1 Immunocard STAT! Test Card for each Sample or Control. When ready to perform testing, remove the Test Card from its foil pouch. Discard the pouch and desiccant. Label the device with the name of the patient or the control.
- Break the top of the vial cap using a piece of paper to prevent leakage.
- Invert the vial and, keeping it in a vertical position, add 4 drops of diluted sample in the Sample Port of each strip (rectangular windows marked with an arrow).
- Incubate the test card at 19-27 C for 15 minutes.
- Visually read the results of each card within 30 seconds at the end of incubation.

INTERPRETATION OF RESULTS

The cassette contains two strips: on the left side the strip for GDH, on the right side the strip for toxins A and B. The possible outcomes are shown in Fig. 1.



NEGATIVE RESULTS: A **BLUE** band at the Control Line position (C). No other bands are present in the two strips of the cassette.

A negative result in the GDH antigen strip indicates *C. difficile* antigen either is absent in the specimen or is below the detection limit of the assay. A negative result in the Toxins strip indicates either *C. difficile* toxins are absent in the specimen or they are below the detection limit of the assay.

POSITIVE RESULTS FOR GDH: A **PINK-RED** band at the TEST (T) Line Position, in the presence of a **BLUE** band at the Control Line Position (C) in the LEFT STRIP of the Cassette. A positive result indicates the presence of *C. difficile* in the sample.

POSITIVE RESULTS FOR TOXINS: A **PINK-RED** band at the TOXIN A (A) and/or the TOXIN B (B) Line Position, in the presence of a **BLUE** band at the Control Line Position (C) in the RIGHT STRIP of the Cassette. A positive result indicates the presence of *C. difficile* toxin(s).

INVALID RESULTS:

- For each strip, No **BLUE** band at the designated position for the Control Line (C). The test is invalid since the absence of a control band indicates that the test procedure was performed improperly or deterioration of reagents has occurred. For reporting a valid result, the **BLUE** bands in both strips should always appear.
- A **PINK-RED** band appearing at either the GDH, toxin A or toxin B test line position of the device **after** the defined incubation limit of 15 minutes or a band of **any color other than PINK-RED**. Falsely positive results may occur if tests are incubated too long. Bands with colors other than pink-red may indicate reagent deterioration or interference.

If any result is difficult to interpret, the test can be repeated with the same sample. Obtain a new sample and retest when the original sample repeatedly produces unreadable results.

Low percentage of specimens may test negative for antigen but positive for toxin(s). These samples should be retested using a fresh specimen. If new sample results negative for antigen but positive for toxin, report as positive toxin(s) result.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing, leakage or any damage.

INTERNAL CONTROLS: Internal controls are contained within the test strip and therefore are evaluated with each test.

- The **BLUE** bands appearing at the Control Line Positions serve as a procedural control and indicate that the test has been performed correctly, proper flow occurred, and the test reagents were active at the time of use.
- A clean background around the Control and Test Lines also serves as a procedural control. Control or test lines that are obscured by heavy background color may invalidate the test and may be an indication of reagent deterioration, use of an inappropriate sample or improper test performance.

EXTERNAL CONTROLS: External Positive and Negative Controls should be assayed with each new kit lot or new shipment. The number of tests performed with the external controls will be determined by the requirements of local, state, federal regulations or accrediting agencies. External controls are used to monitor reagent reactivity and test performance. Failure of the controls to produce the expected results can mean that one of the reagents or components is no longer reactive at the time of use, the test was not performed correctly or that reagents or samples were not added.

The results expected with the controls are described in the section INTERPRETATION OF RESULTS. If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. The kit should not be used if control tests do not produce the correct results.

EXPECTED VALUES

The frequency of antibiotic-associated diarrhea caused by *C. difficile* is dependent on several factors, including patient population, type of institution and epidemiology. The reported incidence of *C. difficile*-associated disease in patients suspected of having antibiotic-associated diseases is 15-20%, although different facilities may find positive rates above or below this range.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The assay is intended to confirm the presence of the GDH common antigen and toxins in patient's stool. A Negative Test result does not completely preclude an infection of a toxigenic *C. difficile* strain. Assay results are to be used in conjunction with information available from the patient clinical evaluation and other diagnostic procedures.
- The test is qualitative and no quantitative interpretation should be made with respect to the intensity of the positive line when reporting the result.
- The test is intended to be used on unpreserved human stool; any other kind of sample has not been validated.

4. Correct stool preservation is essential for reliable results. Sample degradation may determine False Negative results. While relatively stable at 2-8 C, *C. difficile* toxins - particularly at low concentrations - easily degrade at room temperatures. The rate at which the toxins degrade differs from patient sample to patient sample and therefore the rate cannot be predicted. For this reason, best practice requires that samples be refrigerated or frozen within two hours of collection and the samples tested within the timeframes recommended in this insert. Do not accept samples that have not been collected, handled or transported properly.
5. Two distinct groups have been identified that can harbor *C. difficile* asymptomatically at very high rates. Colonization rates of up to 50% and higher have been reported in infants and rates of up to 32% in cystic fibrosis patients.
6. Failure to add the correct amount of stool to the Sample Diluent Vial can lead to falsely negative or falsely positive results.
7. Over incubation of tests may lead to false-positive test results. Incubating tests at reduced temperatures or times may lead to falsely negative results.
8. Highly hemorrhagic samples may interfere with the assay by determining a false negative result or the appearance of aspecific bands. This event is often accompanied by the alteration of the color of the bands. Do not report any result if the bands are not of the correct color (Control Lines must be **BLUE**, Test Lines must be **PINK-RED**) – Refer to Fig. 1.
9. Cross reactivity studies indicated that stool samples strongly positive for *E. histolytica* might interfere with the results, determining a weak positive result for Toxin B.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical performances of Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB have been evaluated on a total of 142 samples for GDH and 138 samples for Toxins A and B. Specimen have been collected retrospectively and stored frozen. The samples have been characterized using commercial ELISA assay for GDH and for TOXINS A&B. Comparative results for Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB are reported below:

Immunocard STAT! <i>C. difficile</i> GDH-AB			
REFERENCE METHOD: ELISA	POS	NEG	TOTAL
POSITIVE	38	2	40
NEGATIVE	1	101	102
Total	39	103	142
		%	CI 95%
Clinical sensitivity- Positive Agreement	38/40	95,0	83,5-98,6
Clinical specificity – Negative Agreement	101/102	99,0	94,6-99,8
Positive Predictive Value (PPV)	38/39	97,4	86,8-99,5
Negative Predictive Value (NPV)	101/103	98,1	93,1-99,5
Immunocard STAT! <i>C. difficile</i> GDH-AB			
REFERENCE METHOD: ELISA	POS	NEG	TOTAL
POSITIVE*	35	2	37
NEGATIVE	0	101	101
Total	35	103	138
		%	CI 95%
Clinical sensitivity – Positive Agreement	36/38	94,6	82,3-98,5
Clinical specificity – Negative Agreement	101/101	100	94,3-100
Positive Predictive Value (PPV)	35/35	100	90-100
Negative Predictive Value (NPV)	101/103	98,1	93,2-99,5

*POSITIVE RESULTS confirmed by CCTNA (cell cytotoxicity & neutralization assay)

ANALYTICAL SENSITIVITY

Limit of Detection of the assay (LoD) has been determined as follows:

- GDH assay: two different preparations of glutamate dehydrogenase (native and recombinant) from *C. difficile* were used to determine the LoD value. A mean value of 0.8 ng/mL was obtained with both preparations.
- TOX A&B assay: toxins A and B from different sources (List Biological Laboratories, tgc BIOMICS and The Native Antigen) were used to determine the LoD value. A mean value of 12.5 ng/mL for toxin A and a mean value of 1.5 ng/mL for toxin B were obtained.

The lower LoD of the test was also determined using real stool samples as matrix. Values were consistent with those obtained as described above.

REPRODUCIBILITY

The reproducibility of the Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB was determined using a single lot of the assay.

INTER-DAY PRECISION

The inter-day precision was measured by preparing serial dilutions (sensitivity curves) for each analyte. The same operator performed testing on four different days with a concordance of 100% in results.

INTER-OPERATOR PRECISION

Inter-operator precision was determined using serial dilutions for each analyte tested in duplicate by five operators on the same day. Differences were observed but in no case exceeded 1 two-fold dilution. The differences were considered as acceptable for a qualitative immunochromatographic technique.

Using a single lot of the assay, a sensitivity curve was measured for each analyte through four days spaced in time. The same sensitivity for GDH and both toxins A and B was obtained.

INTER-OPERATOR PRECISION:

Five operators measured in duplicate a sensitivity curve for each analyte. Differences were observed but in no case exceeded 1 two-fold dilution.

INTER-BATCH PRECISION:

Three different batches of the Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB test were used to measure a sensitivity curve in duplicate. A single person performed the analysis on the same day. Differences of a dilution factor of 2 were observed, which are acceptable and tolerable for this test.

The differences found in the "Reproducibility" sections are acceptable for a qualitative immunochromatographic technique with its inherent variability.

PROZONE / HOOK EFFECT

Very high concentrations of the three analytes detected by the assay have been tested without observing any decrease in the intensity of the positive signals. These concentration values (higher than the maximum values that can be found among the population) are the following ones:

- GDH: 4000 ng/mL, about 1000-fold the assay LoD.
- Toxin A: 5000 ng/mL, about 400-fold the assay LoD.
- Toxin B: 5000 ng/mL, about 1500-fold the assay LoD

INTERFERING SUBSTANCES

The substances indicated in the below table at the concentration specified did not interfere with the results of the test when added to stool samples (positive and negative ones):

Racecadotril	5% {w/v}	Ibuprofen	20% {w/v}
Cimetidine	10% {w/v}	Acetylsalicylic Acid	30% {w/v}
Loperamide	5% {w/v}	Artificial sweetener	5% {w/v}
Metronidazole	10% {w/v}	Palmitic Acid	40% {w/v}
Omeprazole	3% {w/v}	Barium Sulfate	5% {w/v}
Ampicillin	15% {w/v}	Mucin	5% {w/v}

CROSS REACTIVITY

Cross reactivity of the assay was evaluated for different bacteria that can be present in the intestinal tract.

The assay was used to analyze real stool samples that were known to be strongly positive for the following bacteria/viruses and parasites: Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - *Helicobacter pylori* - *Entamoeba histolytica* - *Giardia lamblia* - *Cryptosporidium parvum*

A cross-reaction with stool containing *Entamoeba histolytica* has been registered. When the test is used on the isolated parasite (without the stool matrix) no cross reaction is detected. Refer to Limitation of the Procedure, Point 9.

Additionally, Stool samples inoculated with the following microbial agents (to a final sample concentration of $\sim 1 \times 10^8$ organisms/mL) do not react with the assay:

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

Additional information regarding the performance characteristics of this product can be obtained by contacting Meridian's Technical Support Department at the addresses reported below.

ITALIANO

immunocard STAT!®

C. difficile GDH-AB

**Test immunologico rapido per il rilevamento simultaneo dell'antigene GDH (glutammato deidrogenasi)
e delle tossine A e B di *Clostridium difficile* nelle feci umane**

REF 750520

IVD

FINALITÀ D'USO

Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB è un test rapido, qualitativo immunocromatografico per il rilevamento simultaneo, nelle feci umane, dell'antigene GDH (glutammato deidrogenasi, noto anche come "antigene comune") di *Clostridium difficile* e delle tossine A e B di *Clostridium difficile*. Questo test è da utilizzarsi come ausilio nella diagnosi di malattia associata a *C. difficile*; il medico dovrà valutare i risultati unitamente al quadro clinico, ad altri risultati di laboratorio e ai fattori di rischio epidemiologico.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il *Clostridium difficile* è un batterio anaerobio, gram-positivo, sporigeno che può essere presente asintomaticamente nel 5% della popolazione sana¹. I ceppi tossigenici di *Clostridium difficile* rappresentano la principale causa di diarrea infettiva nosocomiale nei paesi sviluppati, costituendo anche l'agente eziologico in circa il 25% di tutti i casi di diarrea associata agli antibiotici². Si stima che vi siano circa 300.000 casi di infezioni da *C. difficile* (CDAD) ogni anno solo negli ospedali degli Stati Uniti.^{1,2} Potenzialmente, qualsiasi antibiotico è in grado di predisporre un paziente alle CDAD. Il quadro clinico delle CDAD spazia dalla colonizzazione asintomatica a colite pseudomembranosa e megacolon tossico, pericolosi per la vita.² I ceppi patogeni di *C. difficile* producono almeno una di due tossine biologicamente e immunologicamente distinte³: la tossina A (enterotossina) e la tossina B (citotossina), che sono i principali fattori di virulenza responsabili dei segni clinici della malattia.

La glutammato deidrogenasi (GDH), è un enzima prodotto in grandi quantità da ceppi tossigenici e non tossigenici di *C. difficile*, rappresenta quindi un eccellente marcatore per determinare la presenza del microrganismo stesso.⁴

La Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), la Infectious Diseases Society of America (IDSA) e la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) raccomandano diversi approcci di analisi per il rilevamento in laboratorio del *C. difficile*⁵ tossigenico, incluse diverse combinazioni di test per GDH, tossine e tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT). Uno degli algoritmi di test suggeriti consiste nell'uso di un protocollo in due fasi, che prevede uno screening iniziale del campione con un test per GDH e, se il risultato è positivo, l'uso di un secondo test per confermare la tossigenicità del ceppo, poiché solo i ceppi tossigenici e patologici di questo microrganismo producono le tossine. Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB consente al laboratorio di adottare questo approccio, ottenendo simultaneamente i due risultati con un unico test.

Un risultato positivo del test per la glutammato deidrogenasi di *C. difficile* conferma la presenza di questo organismo nel campione fecale; un risultato negativo indica l'assenza dell'organismo. Un risultato positivo del test per le tossine A e/o B conferma la presenza di *C. difficile* tossigenico.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB contiene due strisce collocate in una doppia cassetta, una per il GDH e una per le tossine A e B:

1. La striscia GDH utilizza una combinazione di:
 - a. Particelle di lattice rosa-rosso coniugate ad anticorpi specifici anti-GDH di *C. difficile* e anticorpi specifici anti-GDH immobilizzati in Posizione Test, sotto la banda di Controllo. Durante l'incubazione, se l'antigene GDH è presente, si lega a entrambi gli anticorpi, sviluppando una linea rosa-rossa in Posizione Test.
 - b. Particelle di lattice blu coniugate a un antigene che viene riconosciuto da un anticorpo specifico per tale antigene, legato alla membrana, che definisce la banda di Controllo del test.
2. La striscia TOSSINE utilizza una combinazione di:
 - a. Particelle di lattice rosa-rosso coniugate ad anticorpi specifici per la tossina B e anticorpi specifici per la tossina B immobilizzati in Posizione B, sotto la banda di Controllo. Durante l'incubazione, se la tossina B è presente, si lega a entrambi gli anticorpi, sviluppando una linea rosa-rossa in Posizione B.
 - b. Particelle di lattice rosa-rosso coniugate ad anticorpi specifici per la tossina A e anticorpi specifici per la tossina A immobilizzati in Posizione A, sotto la banda della tossina B. Durante l'incubazione, se la tossina A è presente, si lega a entrambi gli anticorpi, sviluppando una linea rosa-rossa in Posizione A.
 - c. Particelle di lattice blu coniugate a un antigene che viene riconosciuto da un anticorpo specifico per tale antigene, legato alla membrana, che definisce la banda di Controllo del test.

Un campione diluito di feci del paziente viene dispensato in entrambe le porte del campione della cassetta e migra lungo le membrane attraverso le zone Test e Controllo. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la comparsa di una linea colorata specifica nella finestra di lettura accanto alla lettera corrispondente, in presenza della linea del controllo, indica un risultato positivo (vedere la Fig. 1).

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

1. Dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB: due strisce reattive alloggiata in un supporto di plastica, confezionate in una busta di alluminio con un essiccante.
2. Diluente del Campione: soluzione tamponata contenente sodio azide allo 0,095% come conservante. Il diluente viene fornito in un flacone contagocce di plastica monouso con bastoncino applicatore. Pronto all'uso.
3. Pipette di trasferimento monouso

MATERIALI NON FORNITI

1. Set di Controllo Esterno con controlli positivi e negativi, num. cat. Meridian 750501
2. Vortex
3. Timer a intervalli

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Seguire scrupolosamente la procedura qui descritta; in caso contrario, possono verificarsi risultati falsamente positivi o falsamente negativi. Una volta avviato il test, completare tutti i passaggi successivi senza interruzioni.
3. Il campione del paziente e il dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB usato possono contenere agenti infettivi e devono essere trattati osservando il livello di biosicurezza 2 come raccomandato nel manuale CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" (Biosicurezza in microbiologia e nei laboratori biomedici).
4. Non scambiare i reagenti di kit con numeri di lotto diversi e non utilizzare i reagenti scaduti.
5. Non utilizzare il Diluente del Campione se c'è evidenza di contaminazione o precipitazione.
6. Il Diluente del Campione contiene sodio azide che è irritante per la pelle. Evitare il contatto dei reagenti con la pelle. Lo smaltimento di reagenti contenenti sodio azide nelle tubature in piombo o in rame può causare la formazione di azidi metalliche esplosive. Ciò può essere evitato sciacquando con abbondante acqua durante lo smaltimento.
7. La corretta conservazione e diluizione delle feci sono essenziali per garantire risultati corretti. L'aggiunta eccessiva di feci nel Diluente del Campione può limitare il flusso all'interno del dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB, producendo risultati invalidi. L'errata conservazione delle feci o l'aggiunta insufficiente nel Diluente del Campione possono determinare risultati falsi negativi.
8. Nel caso in cui l'imballaggio primario sia danneggiato (busta di alluminio o flacone di diluente), il prodotto deve essere smaltito e non va utilizzato.
9. Non utilizzare questo prodotto se, prima dell'uso, appare una linea colorata nell'area dei risultati di qualsiasi striscia.
10. Se il test viene conservato in frigorifero, attendere che tutti i componenti del kit e i campioni fecali raggiungano la temperatura ambiente, poiché i reagenti e/o i campioni freddi possono ridurre la funzionalità del test.
11. Non gettare la scatola del kit finché non sarà stato utilizzato tutto il contenuto. La scatola contiene informazioni essenziali sul marchio CE del prodotto e sul numero di lotto.
12. Il prodotto usato deve essere smaltito in conformità alle leggi locali vigenti.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associate a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Conservare il kit Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB a 2-30 °C quando non in uso. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit.

NOTE PROCEDURALI

1. Prima di eseguire l'analisi, lasciare che i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (19-27 °C), poiché reagenti e/o campioni freddi possono ridurre la sensibilità del test. Potrebbero essere necessari 60 minuti prima che i reagenti si riscaldino dopo la refrigerazione.
2. Prima del campionamento, al fine di ottenere un campione rappresentativo, i campioni di feci devono essere miscelati accuratamente (indipendentemente dalla consistenza).
3. Tenere i flaconi dei reagenti in posizione verticale quando si dispensano le gocce, in modo da assicurare una regolare erogazione ed una costante dimensione delle gocce.
4. Talvolta il particolato può interferire con il flusso dei campioni. Nei casi in cui il dispositivo di analisi non assorba prontamente il campione diluito, toccare con delicatezza il fondo della porta del campione con un bastoncino applicatore, spostando il particolato solido delle feci che potrebbe impedire l'assorbimento. In alternativa, è possibile prelevare un'altra aliquota dal diluente e ricominciare. I campioni diluiti contenenti un'elevata concentrazione di particolato possono essere centrifugati (1-5 minuti a 700 x G) oppure lasciati riposare per 3-5 minuti prima di procedere.
5. Assicurarsi di prelevare la quantità appropriata di campione: circa 110 mg per campioni solidi (una piccola porzione di circa 5 mm di diametro). Se il campione è semiliquido (e non è possibile prelevare con una pipetta), prelevare una quantità di campione tale da coprire le scanalature del bastoncino fissato al tappo del flacone. Se il campione è liquido, prelevare 110 µL (4 gocce se si utilizzano le pipette monouso fornite con il kit). Queste quantità vengono estratte nel tampone di diluizione del campione fornito nei flaconi inclusi nel kit. Un eccesso di campione in relazione a quanto precedentemente indicato può impedire il corretto funzionamento della cromatografia; ciò è particolarmente importante con i campioni solidi, poiché non è facile prelevare la quantità di campione raccomandata.
6. Assicurarsi di aggiungere il volume corretto del campione estratto alle due porte del campione contrassegnate dalle frecce nel dispositivo di plastica. Se il volume è inferiore a quanto indicato, il flusso potrebbe non verificarsi poiché la quantità di campione che raggiunge le strisce reattive è insufficiente; se il volume è maggiore, potrebbero apparire delle linee marroni invece di quelle previste (vedere la Fig. 1).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono pronti all'uso. Prima dell'uso, lasciare che i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (19-27 °C). Miscelare delicatamente il reagente liquido prima dell'uso. Aprire la busta del dispositivo solo quando si è pronti a eseguire il test.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il test è validato per campioni freschi non trattati. Non utilizzare campioni raccolti su terreni di trasporto o campioni trattati con agenti conservanti (come formalina, SAF, PVA o simili) o terreni di arricchimento, in quanto la loro presenza potrebbe interferire con le corrette prestazioni del test.

I campioni di feci devono essere trasportati in un contenitore ermetico. I campioni devono essere analizzati appena possibile, ma possono essere conservati per un massimo di 2 giorni a 2-8 °C prima dell'analisi. Se il test non può essere eseguito entro questo lasso di tempo, i campioni devono essere congelati immediatamente appena ricevuti e conservati congelati (-20 °C) fino al momento dell'analisi. I campioni possono essere congelati e scongelati due volte. Assicurarsi che i campioni abbiano raggiunto la temperatura ambiente prima di eseguire il test.

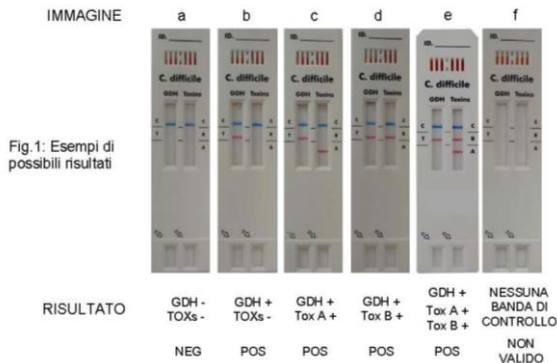
PROCEDURA DEL TEST

Portare tutte le Dispositivi Test, i diluenti dei campioni e i campioni a temperatura ambiente (19-27 °C) prima di eseguire il test. Rimuovere i reagenti dalla scatola del kit per lasciarli riscaldare. Potrebbero essere necessari fino a 60 minuti prima che i reagenti si riscaldino dopo la refrigerazione.

1. Etichettare un flacone di Diluente del Campione per ciascun campione da analizzare.
2. Svitare il tappo del flacone con cautela per evitare di versare il diluente del campione.
3. Aggiungere immediatamente il campione di feci o i controlli come segue:
 - a. Feci formate/solide – Miscelare accuratamente il campione di feci. Usando il bastoncino fissato al tappo del flacone, prelevare una piccola porzione di 5 mm di diametro.
 - b. Feci semisolide – Miscelare accuratamente il campione di feci. Usando il bastoncino fissato al tappo del flacone, prelevare una quantità di campione tale da coprire completamente le scanalature del bastoncino.
 - c. Feci liquide – Utilizzando le pipette monouso fornite nel kit, miscelare accuratamente il campione di feci, prelevare e dispensare nel flacone 4 gocce di feci (corrispondenti a un volume di 110 µL).
 - d. Controllo positivo o negativo esterno: consultare le istruzioni per l'uso del SET DI CONTROLLO ESTERNO.
4. Aggiungere con cautela il campione nel flacone corrispondente contenente il tampone di diluizione. Avvitare saldamente il tappo e agitarlo energicamente per garantire l'omogeneizzazione della miscela.
5. Utilizzare 1 Dispositivo Test Immunocard STAT! per ciascun campione o controllo. Quando si è pronti per eseguire il test, rimuovere il Dispositivo Test dalla busta di alluminio. Smaltire la busta e l'essiccante. Etichettare il dispositivo con il nome del paziente o del controllo.
6. Rompere la parte superiore del tappo del flacone utilizzando un pezzo di carta per evitare perdite.
7. Capovolgere il flacone e, mantenendolo in posizione verticale, aggiungere 4 gocce di campione diluito nella porta del campione di ciascuna striscia (finestre rettangolari contrassegnate da una freccia).
8. Incubare i Dispositivi Test a 19-27 °C per 15 minuti.
9. Leggere visivamente i risultati di ciascun Dispositivo entro 30 secondi alla fine dell'incubazione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La cassetta contiene due strisce: sul lato sinistro la striscia per il GDH, sul lato destro la striscia per le tossine A e B. I risultati possibili sono mostrati nella Fig. 1.



RISULTATI NEGATIVI: una banda **BLU** nella posizione della linea del Controllo (C). Non sono presenti altre bande nelle due strisce della cassetta. Un risultato negativo nella striscia dell'antigene GDH indica che l'antigene di *C. difficile* è assente nel campione o è al di sotto del limite di rilevabilità del test.

Un risultato negativo nella striscia delle tossine indica che le tossine di *C. difficile* sono assenti nel campione o sono al di sotto del limite di rilevabilità del test.

RISULTATI POSITIVI PER GDH: una banda **ROSA-ROSSA** nella posizione della linea del TEST (T), in presenza di una banda **BLU** nella posizione della linea del Controllo (C) nella STRISCIA SINISTRA della cassetta. Un risultato positivo indica la presenza di *C. difficile* nel campione.

RISULTATI POSITIVI PER TOSSINE: una banda **ROSA-ROSSA** nella posizione della linea della TOSSINA A (A) e/o della TOSSINA B (B), in presenza di una banda **BLU** nella posizione della linea del Controllo (C) nella STRISCIA DESTRA della cassetta. Un risultato positivo indica la presenza di tossine di *C. difficile*.

RISULTATI INVALIDI:

- Per ogni striscia, nessuna banda **BLU** nella posizione designata per la linea del Controllo (C). Il test non è valido poiché l'assenza di una banda del controllo indica che la procedura del test è stata eseguita in modo improprio o si è verificato un deterioramento dei reagenti. Per riportare un risultato valido, in entrambe le strisce devono apparire sempre le bande **BLU**.
- Una banda **ROSA-ROSSA** appare nella posizione della linea di Test del GDH, della tossina A o della tossina B **dopo** il limite di incubazione definito di 15 minuti o appare una banda di **qualsiasi colore diverso dal ROSA-ROSSO**. Se i test sono incubati troppo a lungo, possono verificarsi risultati falsamente positivi. Le bande con colori diversi dal rosa-rosso possono indicare deterioramento o interferenza del reagente.

Se uno o più risultati sono difficili da interpretare, è possibile ripetere il test con lo stesso campione. Se il campione originale produce ripetutamente risultati illeggibili, ottenere un nuovo campione e ripetere l'analisi.

Una bassa percentuale di campioni può risultare negativa per l'antigene ma positiva per una o entrambe le tossine. In tal caso è necessario ripetere l'analisi utilizzando un nuovo campione. Se il nuovo campione risulta negativo per l'antigene ma positivo per la tossina, riportare un risultato positivo per la tossina o le tossine.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

Al momento di ogni utilizzo, i componenti del kit devono essere esaminati visivamente per determinare se sono presenti segni evidenti di contaminazione microbica, congelamento, perdite o altri danni.

CONTROLLI INTERNI: i controlli interni sono contenuti all'interno della striscia reattiva e quindi vengono eseguiti con ciascun test.

- Le bande **BLU** che appaiono nelle posizioni della linea del controllo servono come controllo procedurale e indicano che il test è stato eseguito correttamente, si è verificato un flusso corretto e i reagenti del test erano attivi al momento dell'uso.
- Uno sfondo pulito attorno alle linee del controllo e del test funge anche da controllo procedurale. Le linee del controllo o del test che risultano oscurate da un colore di fondo molto forte possono invalidare il test e possono essere un'indicazione di deterioramento del reagente, uso di un campione inappropriato o prestazioni inadeguate del test.

CONTROLLI ESTERNI: per ogni nuovo lotto del kit o nuova spedizione, si raccomanda di eseguire i controlli positivi e negativi esterni. Il numero di test eseguiti con i controlli esterni sarà determinato in base ai requisiti delle normative locali, statali e nazionali o in base ai requisiti di accreditamento. I controlli esterni vengono utilizzati per monitorare la reattività dei reagenti e le prestazioni del test. Se i controlli non producono i risultati attesi, significa che uno dei reagenti o componenti non era più reattivo al momento dell'uso, che il test non è stato eseguito correttamente o che non sono stati aggiunti i reagenti o i campioni.

I risultati attesi dei controlli sono descritti nella sezione INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI. Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se i test di controllo non producono i risultati corretti, il kit non deve essere utilizzato.

VALORI ATTESI

La frequenza della diarrea associata agli antibiotici causata da *C. difficile* dipende da diversi fattori, tra cui la popolazione dei pazienti, il tipo di istituto e l'epidemiologia. L'incidenza riportata di malattie associate a *C. difficile* in pazienti con sospetto di patologie associate agli antibiotici è del 15-20%, sebbene strutture diverse possano riscontrare tassi positivi al di sopra o al di sotto di questo intervallo.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Il test ha lo scopo di confermare la presenza dell'antigene comune GDH e delle tossine nelle feci del paziente. Un risultato negativo del test non preclude completamente l'infezione di un ceppo *C. difficile* tossigenico. I risultati del test devono essere utilizzati insieme alle informazioni ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
2. Il test è qualitativo e, nel riportare il risultato, non deve essere fornita alcuna interpretazione quantitativa rispetto all'intensità della linea positiva.
3. Il test è destinato all'uso su feci umane senza conservanti; non sono stati validati altri tipi di campioni.
4. La corretta conservazione delle feci è essenziale per ottenere risultati affidabili. La degradazione del campione può determinare risultati falsi negativi. Sebbene siano relativamente stabili a 2-8 °C, le tossine di *C. difficile*, in particolare a basse concentrazioni, si degradano facilmente a temperatura ambiente. La velocità con cui le tossine si degradano differisce da campione a campione e pertanto non può essere prevista. Per questo motivo, le migliori pratiche richiedono che i campioni vengano refrigerati o congelati entro due ore dalla raccolta e analizzati entro i tempi raccomandati in queste istruzioni. Non accettare campioni che non siano stati raccolti, gestiti o trasportati correttamente.
5. Sono stati identificati due gruppi distinti in grado di ospitare il *C. difficile* in modo asintomatico in percentuali molto elevate. Sono stati segnalati tassi di colonizzazione fino al 50% e oltre nei neonati e fino al 32% nei pazienti con fibrosi cistica.
6. Se non viene aggiunta la giusta quantità di feci al flacone di Diluente del Campione, si possono ottenere risultati falsamente negativi o falsamente positivi.
7. Un'incubazione eccessiva dei test può portare a risultati falsamente positivi. L'incubazione dei test a temperature o tempi ridotti può portare a risultati falsamente negativi.
8. Campioni altamente emorragici possono interferire con il dosaggio determinando un risultato falsamente negativo o la comparsa di bande aspecifiche. Questo evento è spesso accompagnato dall'alterazione del colore delle bande. Non riportare alcun risultato se le bande non sono del colore corretto: le linee del controllo devono essere **BLU**, le linee del test devono essere **ROSA-ROSSE** (fare riferimento alla Fig. 1).
9. Studi di reattività crociata hanno indicato che campioni di feci fortemente positivi a *E. histolytica* potrebbero interferire con i risultati, determinando un risultato debolmente positivo per la tossina B.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Le prestazioni cliniche di Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB sono state valutate su un totale di 142 campioni per GDH e 138 campioni per le tossine A e B. I campioni sono stati prelevati in modo retrospettivo e conservati congelati. I campioni sono stati caratterizzati utilizzando il test commerciale ELISA per GDH e per le tossine A e B. Di seguito sono riportati i risultati comparativi per Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB:

Immunocard STAT! <i>C.difficile</i> GDH-AB			
STRISCIA GDH			
METODO DI RIFERIMENTO: ELISA	POS	NEG	TOTALE
POSITIVO	38	2	40
NEGATIVO	1	101	102
Totale	39	103	142
		%	IC 95%
Sensibilità clinica - Accordo positivo	38/40	95,0	83,5-98,6
Specificità clinica - Accordo negativo	101/102	99,0	94,6-99,8
Valore predittivo positivo (VPP)	38/39	97,4	86,8-99,5
Valore predittivo negativo (VPN)	101/103	98,1	93,1-99,5
Immunocard STAT! <i>C.difficile</i> GDH-AB			
TOSSINE A e B			
METODO DI RIFERIMENTO: ELISA	POS	NEG	TOTALE
POSITIVO*	35	2	37
NEGATIVO	0	101	101
Totale	35	103	138
		%	IC 95%
Sensibilità clinica - Accordo positivo	36/38	94,6	82,3-98,5
Specificità clinica - Accordo negativo	101/101	100	94,3-100
Valore predittivo positivo (VPP)	35/35	100	90-100
Valore predittivo negativo (VPN)	101/103	98,1	93,2-99,5

*RISULTATI POSITIVI confermati dal CCTNA (test di citotossicità e neutralizzazione cellulare)

SENSIBILITÀ ANALITICA

Il limite di rilevabilità del test (LoD) è stato determinato come segue:

- GDH: per determinare il valore di LoD sono stati utilizzati due diversi preparati di glutammato deidrogenasi (nativo e ricombinante) di *C. difficile*. Con entrambi i preparati è stato ottenuto un valore medio di 0,8 ng/mL.
- TOSSINE A e B: per determinare il valore di LoD sono state utilizzate le tossine A e B da diverse fonti (List Biological Laboratories, tgc BIOMICS e The Native Antigen). È stato ottenuto un valore medio di 12,5 ng/mL per la tossina A e un valore medio di 1,5 ng/mL per la tossina B.

Il LoD inferiore del test è stato anche determinato utilizzando campioni di feci reali come matrice. I valori erano coerenti con quelli ottenuti nel modo descritto sopra.

RIPRODUCIBILITÀ

La riproducibilità di Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB è stata determinata utilizzando un singolo lotto del test.

PRECISIONE INTER-GIORNALIERA

La precisione inter-giornaliera è stata misurata preparando diluizioni seriali (curve di sensibilità) per ciascun analita. Il test è stato eseguito dallo stesso operatore in quattro giorni diversi con una concordanza di risultati del 100%.

PRECISIONE INTER-OPERATORE

La precisione inter-operatore è stata determinata utilizzando diluizioni seriali per ciascun analita analizzate in doppio da cinque operatori nello stesso giorno. Sono state osservate delle differenze ma in nessun caso è stata superata 1 diluizione doppia. Le differenze sono state considerate accettabili per una tecnica immunocromatografica qualitativa.

Utilizzando un singolo lotto del test, è stata misurata una curva di sensibilità per ciascun analita per quattro giorni distanziati nel tempo. È stata ottenuta la stessa sensibilità per GDH e per entrambe le tossine A e B.

PRECISIONE INTER-OPERATORE

Cinque operatori hanno misurato in duplicato una curva di sensibilità per ciascun analita. Sono state osservate delle differenze ma in nessun caso è stata superata 1 diluizione doppia.

PRECISIONE INTER-LOTTO

Sono stati utilizzati tre diversi lotti del test Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB per misurare una curva di sensibilità in duplicato. L'analisi è stata eseguita da una sola persona nello stesso giorno. Sono state osservate delle differenze di un fattore di diluizione pari a 2, ritenute accettabili e tollerabili per questo test.

Le differenze riscontrate nelle sezioni "Riproducibilità" sono accettabili per una tecnica immunocromatografica qualitativa con la sua variabilità intrinseca.

EFFETTO PROZONA/HOOK

Sono state analizzate concentrazioni molto elevate dei tre analiti rilevati dal test senza osservare alcuna diminuzione nell'intensità dei segnali positivi. I valori di concentrazione (superiori ai valori massimi che possono essere riscontrati nella popolazione) sono i seguenti:

- GDH: 4000 ng/mL, circa 1000 volte il valore LoD del test.
- Tossina A: 5000 ng/mL, circa 400 volte il valore LoD del test.
- Tossina B: 5000 ng/mL, circa 1500 volte il valore LoD del test.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze indicate nella tabella seguente alla concentrazione specificata non hanno interferito con i risultati del test quando aggiunte a campioni di feci (positivi e negativi):

Racecadotril	5% (p/v)	Ibuprofene	20% (p/v)
Cimetidina	10% (p/v)	Acido acetilsalilico	30% (p/v)
Loperamide	5% (p/v)	Dolcificante artificiale	5% (p/v)
Metronidazolo	10% (p/v)	Acido palmitico	40% (p/v)
Omeprazolo	3% (p/v)	Solfato di bario	5% (p/v)
Ampicillina	15% (p/v)	Mucina	5% (p/v)

CROSS-REATTIVITÀ

È stata valutata la reattività crociata del test per diversi batteri che possono essere presenti nel tratto intestinale.

Il test è stato utilizzato per analizzare campioni di feci reali noti come fortemente positivi ai seguenti batteri/virus e parassiti:

Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - *Helicobacter pylori* - *Entamoeba histolytica* - *Giardia lamblia* - *Cryptosporidium parvum*

È stata registrata una reazione crociata con le feci contenenti *Entamoeba histolytica*. Quando il test viene utilizzato sul parassita isolato (senza la matrice di feci) non viene rilevata alcuna reazione crociata. Fare riferimento a Limitazioni della procedura, punto 9.

Inoltre, i campioni di feci inoculati con i seguenti agenti microbici (fino a una concentrazione di campione finale di $\sim 1 \times 10^8$ microrganismi/ml) non reagiscono con il test:

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocytogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

Per ulteriori informazioni riguardanti le caratteristiche di prestazione di questo prodotto, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian agli indirizzi riportati di seguito.

FRANÇAIS

immunocard STAT!®

C. difficile GDH-AB

Immuno-essai rapide en une étape pour la détection simultanée de l'antigène glutamate déshydrogénase (GDH) de *Clostridium difficile* et des toxines A et B dans les selles humaines

REF

750520

IVD

BUT DE LA METHODE

L'immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB est un test immunochromatographique qualitatif rapide permettant la détection simultanée dans les selles humaines de l'antigène glutamate déshydrogénase (GDH, également appelé « antigène commun ») du *Clostridium difficile*, et des toxines A et B du *Clostridium difficile*. Ce test s'utilise comme aide au diagnostic de maladies associées au C. *difficile* et les résultats doivent être utilisés par le clinicien en conjonction avec l'aspect clinique, d'autres résultats de laboratoire et les facteurs de risque épidémiologiques.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Clostridium difficile est une bactérie sporulée anaérobie à Gram positif qui peut être présente de manière asymptomatique chez près de 5 % de la population saine¹. Des souches toxigènes du *Clostridium difficile* sont la cause principale de la diarrhée infectieuse nosocomiale dans les pays développés, et sont également l'agent étiologique d'environ 25 % de tous les cas de diarrhée associés aux antibiotiques⁵. Le nombre de cas d'infection à *C. difficile* (ICD) est estimé à 300 000 par an dans les hôpitaux des Etats-Unis seulement.^{1,2} Presque n'importe quel antibiotique peut prédisposer un patient à une ICD. L'aspect clinique pour l'ICD va de la colonisation asymptomatique jusqu'aux maladies potentiellement mortelles que sont la colite pseudomembraneuse et le mégacolon toxique.² Les souches pathogènes de *C. difficile* produisent au moins une des deux toxines suivantes, qui diffèrent du point de vue biologique et immunologique³ : la toxine A (entérotoxine) et la toxine B (cytotoxine), qui sont les principaux facteurs de virulence responsables des signes cliniques de la maladie.

La glutamate déshydrogénase (GDH), est une enzyme produite en grandes quantités par les souches toxigènes et non toxigènes de *C. difficile*, ce qui en fait un excellent marqueur pour déterminer la présence de ce microorganisme⁴.

La Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) et la Société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses (ESCMID) recommandent différentes approches de test pour la détection en laboratoire du *C. difficile* toxigène⁵, y compris différentes combinaisons de tests de la GDH, des toxines et de TAAN. Un des algorithmes de test suggérés consiste à suivre un protocole en deux étapes impliquant un dépistage initial de l'échantillon avec un test de la GDH puis, si le résultat est positif, un second test pour confirmer la toxinogénicité de la souche, car seules les souches toxigènes et pathologiques de ce microorganisme produisent les toxines. Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB permet à un laboratoire d'adopter cette approche en obtenant les deux résultats simultanément grâce à un test en une seule étape.

Un résultat positif du test pour la glutamate déshydrogénase de *C. difficile* confirme la présence de cet organisme dans un échantillon fécal ; un résultat négatif indique l'absence de l'organisme. Un résultat positif au test pour les toxines A et/ou B confirme la présence de *C. difficile* toxigène.

PRINCIPE DU TEST

Le test Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB contient deux bandelettes placées dans une double cassette, une pour la GDH et une pour les toxines A et B :

1. La bandelette GDH utilise la combinaison suivante :
 - a. Particules de latex roses-rouges conjuguées à des anticorps spécifiques agissant contre la GDH de *C. difficile* et anticorps spécifiques à la GDH immobilisés dans la position de test, en-dessous de la ligne de contrôle. Pendant l'incubation, si l'antigène GDH est présent, il se lie à ces deux anticorps, développant une ligne rose-rouge sur la position de test.
 - b. Particules de latex bleues conjuguées à un antigène reconnu par un anticorps spécifique à cet antigène, lié à la membrane, définissant la ligne de contrôle du test.
2. La bandelette des TOXINES utilise la combinaison suivante :
 - a. Particules de latex roses-rouges conjuguées à des anticorps spécifiques agissant contre la toxine B et anticorps spécifiques à la toxine B immobilisés en position B, en-dessous de la ligne de contrôle. Pendant l'incubation, si la toxine B est présente, elle se lie à ces deux anticorps, développant une ligne rose-rouge sur la position B.
 - b. Particules de latex roses-rouges conjuguées à des anticorps spécifiques agissant contre la toxine A et anticorps spécifiques à la toxine A immobilisés en position A, en-dessous de la ligne de toxine B. Pendant l'incubation, si la toxine A est présente, elle se lie à ces deux anticorps, développant une ligne rose-rouge sur la position A.
 - c. Particules de latex bleues conjuguées à un antigène reconnu par un anticorps spécifique à cet antigène, lié à la membrane, définissant la ligne de contrôle du test.

Un échantillon dilué des selles d'un patient est dispensé dans les deux orifices pour échantillon de la cassette et migre le long des membranes au travers des zones de test et de contrôle. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, l'apparition d'une ligne d'une couleur spécifique dans la fenêtre de lecture à côté de la lettre correspondante indique un résultat positif en présence de la ligne de contrôle (voir Fig. 1).

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

1. Dispositif Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB : Deux bandelettes réactives dans un cadre en plastique et emballées dans une pochette en aluminium avec un dessiccant.
2. Flacons de diluant d'échantillon : Solution tamponnée contenant 0,095 % d'azide de sodium comme agent conservateur. Le diluant est fourni dans un flacon compte-goutte en plastique à usage unique avec une tige d'application. Utiliser le produit fourni.
3. Pipettes de transfert jetables

MATERIEL NON FOURNI

1. Kit de contrôle externe avec contrôles positif et négatif. Catalogue Meridian 750501
2. Vortex
3. Minuteur

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas dévier de la méthode décrite ici sous peine de résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Une fois que le test a démarré, exécuter les étapes subséquentes sans interruption.
3. L'échantillon du patient et le dispositif Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB utilisés peuvent contenir des agents infectieux et doivent être manipulés conformément au niveau de biosécurité 2, comme recommandé dans le manuel de sécurité biologique en laboratoire du CDC/NIH.
4. Ne pas interchanger les réactifs de différents numéros de lot de kit et ne pas utiliser de réactifs ayant dépassé leur date d'expiration.
5. Ne pas utiliser le tampon de dilution d'échantillon en cas d'évidence de contamination ou de trouble.
6. Le tampon de dilution d'échantillon contient de l'azide de sodium qui est irritant pour la peau. Eviter tout contact des réactifs avec la peau. L'élimination de réactifs contenant de l'azide de sodium dans des tuyauteries en plomb ou en cuivre peut provoquer la formation d'azides de métal explosifs. Cela peut être évité en rinçant avec un grand volume d'eau pendant cette élimination.
7. La conservation et la dilution correctes des selles sont essentielles pour garantir des résultats corrects. Une inoculation trop importante de selles dans le diluant d'échantillon peut inhiber le flux dans le dispositif Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB et provoquer des résultats non valides. Une conservation incorrecte des selles ou une sous-inoculation dans le diluant d'échantillon peuvent provoquer des résultats faussement négatifs.
8. Si l'emballage primaire est endommagé (pochette en aluminium ou flacon de tampon diluant), le produit doit être mis au rebut et ne doit pas être utilisé.
9. Ne pas utiliser ce produit si une ligne de couleur apparaît dans la zone des résultats de n'importe quelle bandelette avant de commencer à l'utiliser.
10. Si le coffret de tests est conservé par réfrigération, laisser les composants du coffret et les échantillons fécaux atteindre la température ambiante, car la basse température des réactifs et/ou des échantillons peut réduire la fonctionnalité du test.
11. Ne pas jeter la boîte du kit tant que l'ensemble de son contenu n'a pas été utilisé. Cette boîte contient des informations essentielles sur la marque CE du produit et le numéro de lot.
12. Le produit usagé doit être mis au rebut conformément aux lois locales en vigueur.

DANGER ET MISES EN GARDE

A notre connaissance, il n'y a pas de risque connu associé à ce produit.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Conserver le kit Immunocard STAT1 *C. difficile* GDH-AB entre 2 et 30 °C quand il n'est pas utilisé. La date d'expiration du kit figure sur l'étiquette du kit.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

1. Laisser les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante (entre 19 et 27 °C) avant d'effectuer un test, car une basse température des réactifs et/ou des échantillons peut diminuer la sensibilité du test. Les réactifs peuvent prendre jusqu'à 60 minutes pour se réchauffer après une réfrigération.
2. Les échantillons de selles doivent être mélangés soigneusement (quelle que soit leur consistance) avant l'échantillonnage pour garantir l'obtention d'un échantillon représentatif.
3. Tenir le flacon de réactif à la verticale lors de la distribution pour assurer que les gouttes ont une taille correcte et qu'elles sont distribuées régulièrement.
4. Il peut arriver que les particules de selles inhibent le flux de l'échantillon. Lorsque le dispositif de test n'absorbe pas facilement l'échantillon dilué, toucher délicatement le fond de la fenêtre échantillon avec un bâtonnet applicateur pour bouger les particules solides de selles qui empêchent l'absorption. Alternativement, on peut prendre une nouvelle aliquote d'échantillon à partir du diluant et tester à nouveau. Les échantillons dilués contenant une concentration importante de particules peuvent être centrifugés (1 à 5 minutes à 700 x G) ou laissés à décanter pendant 3 à 5 minutes avant de continuer.
5. Veiller à prendre la quantité appropriée d'échantillon : environ 110 mg pour les échantillons solides (une petite portion d'environ 5 mm de diamètre). Si l'échantillon est semi-liquide (impossible de le prendre avec une pipette), prendre une quantité capable de couvrir les rainures de la tige attachée au capuchon du flacon. Si l'échantillon est liquide, recueillir 110 µL (4 gouttes si les pipettes jetables fournies avec le kit sont utilisées). Ces quantités sont extraites dans le tampon de dilution d'échantillon dans les flacons fournis dans le kit. Une quantité trop importante d'échantillon par rapport à ce qui a été décrit précédemment peut empêcher le déroulement correct de la chromatographie ; cela est particulièrement important avec les échantillons solides, car il n'est pas facile de prendre la quantité d'échantillon recommandée.
6. Veiller à ajouter le volume correct de l'échantillon extrait dans les deux orifices pour échantillon marqués d'une flèche dans le dispositif en plastique. Si le volume est inférieur à ce qui est indiqué, le flux peut ne pas se produire en raison de la quantité insuffisante d'échantillon qui atteint les zones réactives ; si le volume est plus grand, des lignes marrons peuvent apparaître au lieu des lignes attendues (voir Fig. 1).

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs sont fournis prêts à l'emploi. Laisser les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante (entre 19 et 27 °C) avant de les utiliser. Mélanger doucement les réactifs liquides avant l'utilisation. Ouvrir la pochette du dispositif seulement quand vous êtes prêt à réaliser le test.

PRELEVEMENT ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS

Le test a été validé pour des échantillons frais non traités. Ne pas utiliser d'échantillons recueillis dans des milieux de transport, ni ceux possédant des agents conservateurs ajoutés (formol, SAF, PVA ou similaire) ou des milieux d'enrichissement, car leur présence pourrait interférer avec les performances correctes du test.

Les échantillons de selles doivent être transportés dans un récipient hermétique. L'échantillon doit être testé dès que possible, mais peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant 2 jours maximum avant d'être testé. Si le test ne peut pas être réalisé dans cette période de temps, les échantillons doivent être congelés immédiatement au moment de leur réception et conservés congelés (-20 °C) jusqu'au test. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés deux fois. Veiller à ce que les échantillons aient atteint la température ambiante avant de tester.

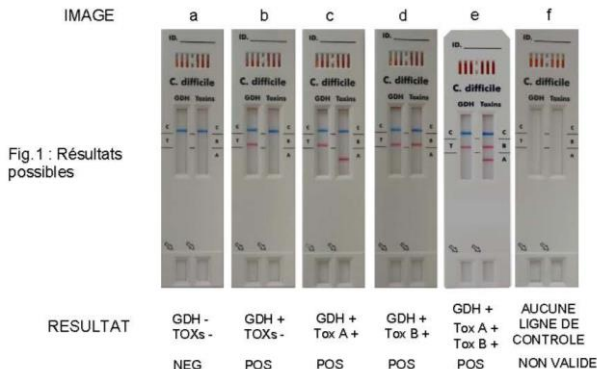
PROCEDURE DE TEST

Amener les cartes de test, les diluants d'échantillon et les échantillons à température ambiante (entre 19 et 27 °C) avant de tester. Sortir les réactifs de la boîte du kit pour les réchauffer. Les réactifs peuvent prendre jusqu'à 60 minutes pour se réchauffer après une réfrigération.

1. Etiqueter un flacon de diluant d'échantillon pour chaque échantillon de patient à tester.
2. Dévisser le capuchon du flacon avec soin afin de ne pas renverser le tampon diluant d'échantillon.
3. Ajouter immédiatement l'échantillon de selles ou les contrôles comme suit:
 - a. Selles formées/solides – Mélanger l'échantillon de selles minutieusement. A l'aide de la tige fixée au capuchon du flacon, recueillir une petite portion de 5 mm de diamètre.
 - b. Selles semi-solides - Mélanger l'échantillon de selles minutieusement. A l'aide de la tige attachée au capuchon du flacon, recueillir une quantité d'échantillon qui couvre complètement les rainures de la tige.
 - c. Selles liquides - A l'aide des pipettes jetables fournies dans le kit, mélanger l'échantillon de selles minutieusement, recueillir et mettre dans le flacon 4 gouttes de selles (correspondant à un volume de 110 µL).
 - d. Contrôle externe positif ou négatif : reportez-vous au mode d'emploi du KIT DE CONTROLE EXTERNE.
4. Ajouter avec soin l'échantillon dans le flacon correspondant contenant le tampon de dilution. Visser le capuchon fermement et le secouer vigoureusement pour assurer l'homogénéité du mélange.
5. Utiliser 1 carte de test immunocard STAT1 pour chaque échantillon ou contrôle. Une fois prêt à réaliser le test, enlever la carte de test de sa pochette en aluminium. Jeter la pochette et le dessiccant. Etiqueter le dispositif en mettant le nom du patient ou le contrôle.
6. Casser le haut du capuchon du flacon en utilisant un morceau de papier pour empêcher les fuites.
7. Retourner le flacon et, en le maintenant en position verticale, ajouter 4 gouttes d'échantillon dilué dans l'orifice d'échantillonnage de chaque bandelette (fenêtres rectangulaires marquées d'une flèche).
8. Incuber la carte de test entre 19 et 27 °C pendant 15 minutes.
9. Lire les résultats de chaque carte dans les 30 secondes suivant la fin de l'incubation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La cassette contient deux bandelettes : à gauche la bandelette pour la GDH, à droite la bandelette pour les toxines A et B. Les résultats possibles sont illustrés dans la Fig. 1.



RESULTATS NEGATIFS : Une ligne **BLEUE** à la position de la ligne de contrôle (C). Aucune autre ligne n'est présente dans les deux bandelettes de la cassette.

Un résultat négatif dans la bandelette de l'antigène GDH indique que l'antigène *C. difficile* est soit absent de l'échantillon, soit en dessous de la limite de détection du test.

Un résultat négatif dans la bandelette des toxines indique soit que les toxines de *C. difficile* sont absentes de l'échantillon, soit qu'elles sont en dessous de la limite de détection du test.

RESULTATS POSITIFS POUR GDH : Une ligne **ROSE-ROUGE** à la position TEST (T), en présence d'une ligne **BLEUE** à la position de la ligne de contrôle (C) dans la BANDELETTE GAUCHE de la cassette. Un résultat positif indique la présence de *C. difficile* dans l'échantillon.

RESULTATS POSITIFS POUR LES TOXINES : Une ligne **ROSE-ROUGE** à la position TOXINE A (A) et/ou TOXINE B (B), en présence d'une ligne **BLEUE** à la position de la ligne de contrôle (C) dans la BANDELETTE DROITE de la cassette. Un résultat positif indique la présence de toxine(s) de *C. difficile*.

RESULTATS NON VALIDES :

- Pour chaque bandelette, aucune ligne **BLEUE** n'apparaît à la position désignée pour la ligne de contrôle (C). Le test n'est pas valide car l'absence d'une ligne de contrôle indique que la procédure de test a été mal réalisée ou que les réactifs ont été détériorés. Pour qu'un résultat soit valide, les lignes **BLEUES** des deux bandelettes doivent toujours apparaître.
- Une ligne **ROSE-ROUGE** qui apparaît à la position de la ligne de test GDH, toxine A ou toxine B du dispositif **après** la limite d'incubation définie de 15 minutes ou une ligne de **n'importe quelle couleur autre que ROSE-ROUGE**. Des résultats faussement positifs peuvent apparaître si les tests sont incubés trop longtemps. Les lignes de couleur autres que rose-rouge peuvent indiquer une détérioration du réactif ou une interférence.

Si un résultat est difficile à interpréter, le test peut être répété avec le même échantillon. Se procurer un nouvel échantillon et tester de nouveau quand l'échantillon d'origine produit des résultats illisibles de manière répétée.

Un faible pourcentage d'échantillons peut donner un résultat négatif à l'antigène mais positif à une ou aux deux toxines. Ces échantillons doivent être retestés avec un échantillon frais. Si le nouvel échantillon donne un résultat négatif pour l'antigène, mais positif pour une toxine, le consigner comme positif pour la ou les toxines.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

Au moment de chaque utilisation, les composants du kit doivent être examinés visuellement pour détecter toute trace évidente de contamination microbienne, de congélation, de fuite ou de dommages.

CONTROLES INTERNES : Les contrôles internes sont contenus à l'intérieur de la bandelette de test et sont donc évalués avec chaque test.

- Les lignes **BLEUES** qui apparaissent aux positions de la ligne de contrôle servent à contrôler la procédure et indiquent que le test a été réalisé correctement, qu'un écoulement correct s'est produit et que les réactifs de test étaient actifs au moment de leur utilisation.
- Un arrière-plan propre autour des lignes de contrôle et de test sert aussi à contrôler la procédure. Des lignes de contrôle ou de test qui sont obscurcies par une couleur d'arrière-plan sombre peuvent rendre le test non valide et peuvent indiquer la détérioration du réactif, l'utilisation d'un échantillon non approprié ou des performances incorrectes du test.

CONTROLES EXTERNES : Les contrôles externes positifs et négatifs doivent être testés avec chaque nouveau lot de kits ou chaque nouveau lot reçu. Le nombre de tests réalisés avec les contrôles externes sera déterminé par les exigences des réglementations locales ou nationales ou des agences d'accréditation. Les contrôles externes s'utilisent pour surveiller la réactivité des réactifs et les performances du test. Si les contrôles ne produisent pas les résultats attendus, cela peut signifier qu'un des réactifs ou un des composants n'est plus réactif au moment de l'utilisation, que le test n'a pas été réalisé correctement ou que des réactifs ou les échantillons n'ont pas été ajoutés.

Les résultats attendus avec les contrôles sont décrits dans la section INTERPRETATION DES RESULTATS. Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée. Le kit ne doit pas être utilisé si les tests de contrôle ne produisent pas les résultats corrects.

VALEURS ATTENDUES

La fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques provoquée par le *C. difficile* dépend de plusieurs facteurs, y compris la population de patients, le type d'établissement et l'épidémiologie. L'incidence rapportée de maladies associées au *C. difficile* chez les patients qui sont soupçonnés de souffrir de maladies associées aux antibiotiques est de 15 à 20 %, bien que les taux positifs peuvent être supérieurs ou inférieurs à cette plage selon l'établissement.

LIMITES DU TEST

- Le test a été conçu pour confirmer la présence de l'antigène commun et des toxines de la GDH dans les selles d'un patient. Un résultat de test négatif n'exclut pas complètement une infection par une souche de *C. difficile* toxigène. Les résultats de test doivent être utilisés en conjonction avec les informations disponibles fournies par l'évaluation clinique du patient et d'autres procédures de diagnostic.
- Le test est qualitatif et aucune interprétation quantitative ne doit être déduite quant à l'intensité de la ligne positive lors du rendu du résultat.
- Le test a été prévu pour être utilisé sur des selles humaines sans agents conservateurs ; aucun autre type d'échantillon n'a été validé.
- Une conservation correcte des selles est essentielle pour des résultats fiables. La dégradation de l'échantillon peut entraîner des résultats faussement négatifs. Bien que relativement stables entre 2 et 8 °C, les toxines de *C. difficile*, particulièrement à faible concentration, peuvent se dégrader facilement à température ambiante. La vitesse à laquelle les toxines se dégradent diffère d'un échantillon de patient à l'autre et ne peut donc pas être prédite. C'est pourquoi la meilleure pratique consiste à réfrigérer ou congeler les échantillons dans les deux heures suivant leur prélèvement et les tester dans les temps indiqués dans la présente notice. Ne pas accepter d'échantillons qui n'ont pas été prélevés, manipulés ou transportés correctement.
- Deux groupes distincts ont été identifiés pouvant héberger *C. difficile* de façon asymptomatique à des niveaux très élevés. Des taux de colonisation jusqu'à 50 % et plus ont été trouvés chez des nourrissons et des taux jusqu'à 32 % chez des patients souffrant de fibrose kystique.
- Si la quantité de selles ajoutée au flacon de diluant d'échantillon est incorrecte, les résultats obtenus peuvent être faussement positifs ou faussement négatifs.
- Une durée trop longue d'incubation des tests peut provoquer des résultats de test faussement positifs. L'incubation des tests à une température réduite ou pendant une durée réduite peut provoquer des résultats faussement négatifs.
- Il est possible que des échantillons hautement hémorragiques perturbent le test en donnant un résultat faussement négatif ou l'aspect de lignes aspécifiques. Cet événement est souvent accompagné de l'altération de la couleur des lignes. Ne pas enregistrer les résultats si les lignes ne sont pas de la couleur correcte (les lignes de contrôle doivent être **BLEUES**, les lignes de test doivent être **ROSES-ROUGES**). Se reporter à la Fig. 1.
- Des études de réactivité croisée ont indiqué que les échantillons de selles comportant un niveau hautement positif de *E. histolytica* peuvent perturber les résultats, donnant un résultat faiblement positif pour la toxine B.

PERFORMANCES SPECIFIQUES

Les performances cliniques d'Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB ont été évaluées sur un total de 142 échantillons pour la GDH et 138 échantillons pour les toxines A et B. Les échantillons ont été prélevés rétrospectivement et conservés congelés. Les échantillons ont été caractérisés à l'aide de tests ELISA disponibles dans le commerce pour la GDH et pour les TOXINES A et B. Les résultats comparatifs pour Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB sont rapportés ci-dessous :

Immunocard STAT! <i>C. difficile</i> GDH-AB BANDELETTE GDH			
METHODE DE REFERENCE : ELISA	POS	NEG	TOTAL
POSITIF	38	2	40
NEGATIF	1	101	102
Total	39	103	142
		%	IC 95 %
Sensibilité clinique - Accord positif	38/40	95,0	83,5-98,6
Spécificité clinique – Accord négatif	101/102	99,0	94,6-99,8
Valeur prédictive positive (PPV)	38/39	97,4	86,8-99,5
Valeur prédictive négative (NPV)	101/103	98,1	93,1-99,5
Immunocard STAT! <i>C. difficile</i> GDH-AB TOXINES A ET B			
METHODE DE REFERENCE : ELISA	POS	NEG	TOTAL
POSITIF*	35	2	37
NEGATIF	0	101	101
Total	35	103	138
		%	IC 95 %
Sensibilité clinique – Accord positif	36/38	94,6	82,3-98,5
Spécificité clinique – Accord négatif	101/101	100	94,3-100
Valeur prédictive positive (PPV)	35/35	100	90-100
Valeur prédictive négative (NPV)	101/103	98,1	93,2-99,5

*RESULTATS POSITIFS confirmés par CCNA (test de cytotoxicité de cellule et de neutralisation)

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La limite de détection (LoD) du test a été déterminée comme suit :

- Test GDH : deux préparations de glutamate déshydrogénase (native et recombinante) de *C. difficile* ont été utilisées pour déterminer la valeur de la LoD. Une valeur moyenne de 0,8 ng/mL a été obtenue avec les deux préparations.
- Test TOX A ET B : les toxines A et B de différentes sources (List Biological Laboratories, tgc BIOMICS et The Native Antigen) ont été utilisées pour déterminer la valeur de LoD. Une valeur moyenne de 12,5 ng/mL pour la toxine A et une valeur moyenne de 1,5 ng/mL pour la toxine B ont été obtenues.

La LoD la plus basse du test a aussi été déterminée en utilisant des échantillons de selles réels comme matrice. Les valeurs étaient cohérentes avec celles obtenues comme décrit ci-dessus.

REPRODUCTIBILITE DU TEST

La reproductibilité du test Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB a été déterminée à l'aide d'un seul lot du test.

PRECISION INTER-JOURS

La précision inter-jours a été mesurée en préparant des dilutions en série (courbes de sensibilité) pour chaque analyte. Le même opérateur a réalisé un test pendant quatre jours différents avec une concordance de 100 % des résultats.

PRECISION INTER-OPERATEURS

La précision inter-opérateurs a été déterminée en utilisant des dilutions en série pour chaque analyte testées en double par cinq opérateurs le même jour. Des différences ont été observées, mais n'ont jamais dépassé 1 dilution de deux en deux. Les différences ont été considérées comme acceptables pour une technique immunochromatographique qualitative.

En utilisant un seul lot du test, une courbe de sensibilité a été mesurée pour chaque analyte sur quatre jours espacés dans le temps. La même sensibilité pour la GDH et les deux toxines A et B a été obtenue.

PRECISION INTER-OPERATEURS :

Cinq opérateurs ont mesuré en double une courbe de sensibilité pour chaque analyte. Des différences ont été observées, mais n'ont jamais dépassé 1 dilution de deux en deux.

PRECISION INTER-LOTS :

Trois lots différents du test Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB ont été utilisés pour mesurer une courbe de sensibilité en double. Une seule personne a réalisé l'analyse le même jour. Des différences d'un facteur de dilution de 2 ont été observées, ce qui est acceptable et tolérable pour ce test.

Les différences trouvées dans les sections « reproductibilité » sont acceptables pour une technique immunochromatographique qualitative avec sa variabilité inhérente.

EFFET PROZONE

Les très fortes concentrations des trois analytes détectées par le test ont été testées sans observer aucune diminution d'intensité des signaux positifs. Ces valeurs de concentration (plus élevées que les valeurs maximum qui peuvent être trouvées parmi la population) sont les suivantes :

- GDH : 4 000 ng/mL, environ 1 000 fois la LoD du test.
- Toxine A : 5 000 ng/mL, environ 400 fois la LoD du test.
- Toxine B : 5 000 ng/mL, environ 1 500 fois la LoD du test.

SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous à la concentration spécifiée n'ont pas interféré avec les résultats du test quand elles ont été ajoutées aux échantillons de selles (positifs et négatifs) :

Racécadotril	5 % {poids/vol.}	Ibuprofène	20 % {poids/vol.}
Cimétidine	10 % {poids/vol.}	Acide acétylsalicylique	30 % {poids/vol.}
Lopéramide	5 % {poids/vol.}	Edulcorant artificiel	5 % {poids/vol.}
Métronidazole	10 % {poids/vol.}	Acide palmitique	40 % {poids/vol.}
Oméprazole	3 % {poids/vol.}	Sulfate de baryum	5 % {poids/vol.}
Ampicilline	15 % {poids/vol.}	Mucine	5 % {poids/vol.}

REACTIVITE CROISEES

La réactivité croisée du test a été évaluée pour différentes bactéries pouvant être présentes dans le tube digestif.

Le test a été utilisé pour analyser des échantillons de selles réels qui étaient connus comme étant hautement positifs pour la présence des bactéries/virus et parasites suivants : Adénovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - *Helicobacter pylori* - *Entamoeba histolytica* – *Giardia lamblia* - *Cryptosporidium parvum*

Une réaction croisée avec des selles contenant *Entamoeba histolytica* a été enregistrée. Quand le test est utilisé sur le parasite isolé (sans la matrice des selles), aucune réaction croisée n'est détectée. *Se reporter à la section Limites de la procédure, Point 9.*

De plus, les échantillons de selles inoculés avec les agents microbiens suivants (à une concentration finale de l'échantillon de ~ 1 x 10⁸ organismes/mL) ne réagissent pas avec le test :

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

Des informations supplémentaires concernant les performances de ce produit peuvent être obtenues en contactant le service d'assistance technique de Meridian aux adresses indiquées ci-dessous.

immunocard STAT!

C. difficile GDH-AB

Inmunoanálisis rápido de un solo paso para la detección simultánea del antígeno de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en heces humanas

REF

750520

IVD

USO INDICADO

Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB es un ensayo inmunocromatográfico cualitativo rápido para la detección simultánea en heces humanas del antígeno de la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *Clostridium difficile* –también llamado “antígeno común”– y de las toxinas A y B de *Clostridium difficile*. Este ensayo se utiliza como complemento para el diagnóstico de la enfermedad asociada a C. difficile, y el médico debe valorar los resultados junto con el cuadro clínico, otros hallazgos analíticos y los factores de riesgo epidemiológico.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia, grampositiva y formadora de esporas que puede estar presente de forma asintomática hasta en el 5 % de la población sana¹. Las cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* son la principal causa de diarrea infecciosa hospitalaria en los países desarrollados, y también es el agente etiológico de aproximadamente el 25 % de todos los casos de diarrea postantibiótica². Según las estimaciones, solo en los hospitales de los Estados Unidos, hay 300 000 casos de infección por C. difficile (EACD, enfermedad asociada a *Clostridium difficile*) al año^{1,2}. Prácticamente cualquier antibiótico puede predisponer a un paciente a la EACD. El cuadro clínico de la EACD puede ir desde una colonización asintomática hasta una colitis pseudomembranosa potencialmente mortal y megacolon tóxico². Las cepas patógenas de C. difficile producen al menos una de dos toxinas distintas desde el punto de vista biológico e inmunológico³: la toxina A (enterotoxina) y la toxina B (citotoxina), que son los principales factores de virulencia responsables de los signos clínicos de la enfermedad.

La glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima que producen en grandes cantidades las cepas toxigénicas y no toxigénicas de C. difficile, lo que la convierte en un excelente marcador para determinar la presencia de este microorganismo⁴.

La Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), la Infectious Diseases Society of America (IDSA) y la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) recomiendan diferentes métodos de análisis para la detección en el laboratorio de cepas toxigénicas de C. difficile⁵, incluyendo diferentes combinaciones de ensayos de GDH, toxinas y PAAN. Uno de los algoritmos de análisis recomendados consiste en usar un protocolo de dos pasos, con un cribado inicial de la muestra mediante un análisis de GDH y, si el resultado es positivo, una segunda prueba para confirmar la toxigenicidad de la cepa, ya que solo producen toxinas las cepas toxigénicas y patológicas de este microorganismo. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB permite a un laboratorio adoptar este enfoque, y obtener simultáneamente los dos resultados con un ensayo de un solo paso.

Un resultado positivo en la prueba de glutamato deshidrogenasa de C. difficile confirma la presencia de este organismo en una muestra fecal; un resultado negativo indica la ausencia del organismo. Un resultado positivo en la prueba de las toxinas A y/o B confirma la presencia de una cepa de C. difficile toxigénica.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La prueba Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB contiene dos tiras dispuestas en un casete doble, una para GDH y otra para las toxinas A y B:

1. La tira de GDH utiliza una combinación de lo siguiente:
 - a. Partículas de látex de color rosado-rojo conjugadas con anticuerpos específicos para la GDH de C. difficile, y anticuerpos específicos para GDH inmovilizados en la posición analítica, debajo de la banda de control. Durante la incubación, si hay antígenos de GDH presentes, se unen a ambos anticuerpos, produciendo una línea rosada-roja en la posición analítica.
 - b. Partículas de látex de color azul conjugadas con un antígeno que reconoce un anticuerpo específico unido a la membrana, y que define la banda de control del análisis.
2. La tira de TOXINAS utiliza una combinación de lo siguiente:
 - a. Partículas de látex de color rosado-rojo conjugadas con anticuerpos específicos para la toxina B, y anticuerpos específicos para la toxina B inmovilizados en la posición B, debajo de la banda de control. Durante la incubación, si hay toxina B presente, se une a ambos anticuerpos, produciendo una línea rosada-roja en la posición B.
 - b. Partículas de látex de color rosado-rojo conjugadas con anticuerpos específicos para la toxina A, y anticuerpos específicos para la toxina A inmovilizados en la posición A, debajo de la banda de la toxina B. Durante la incubación, si hay toxina A presente, se une a ambos anticuerpos, produciendo una línea rosada-roja en la posición A.
 - c. Partículas de látex de color azul conjugadas con un antígeno que reconoce un anticuerpo específico unido a la membrana, y que define la banda de control del análisis.

Se dispensa una muestra de heces diluidas del paciente en los dos puertos de muestreo del casete, que migra a lo largo de las membranas y a través de las zonas de análisis y control. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la aparición de una línea de color determinado en la ventana de lectura junto a la letra correspondiente indica un resultado positivo, siempre que también aparezca la línea de control (véase la figura 1).

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se pueden obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. Dispositivo Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB: dos tiras reactivas dispuestas en un marco de plástico y dentro de una bolsa de papel de aluminio con un desecante.
2. Frascos de diluyente de la muestra: solución tamponada con azida sódica al 0,095 % como conservante. El diluyente se suministra en un frasco cuentagotas de plástico de un solo uso con una varilla aplicadora. Se usa tal y como viene.
3. Pipetas de transferencia desechables.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Juego de controles externos con controles positivo y negativo. Ref. Meridian n.º 750501
2. Agitador vórtex
3. Temporizador de intervalos

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son solo para uso diagnóstico in vitro.
2. No debe desviarse del método que aquí se describe, ya que podrían obtenerse resultados falsos positivos o negativos. Una vez iniciado el análisis, complete todos los pasos subsiguientes sin interrupción.
3. La muestra del paciente y el dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB usados pueden contener agentes infecciosos, y deben manipularse con un nivel 2 de bioseguridad, tal y como se recomienda en el manual de "Bioseguridad en los laboratorios de microbiología y biomedicina" de los CDC y el NIH.
4. No intercambie reactivos de kits que tengan diferentes números de lote, ni utilice reactivos caducados.
5. No utilice el tampón de dilución de muestras si presenta signos de contaminación o precipitación.
6. El tampón de dilución de muestras contiene azida sódica, un compuesto que provoca irritación cutánea. Procure que los reactivos no entren en contacto con la piel. La eliminación de reactivos con azida sódica a través de tuberías de plomo o cobre puede provocar la formación de azidas metálicas explosivas. Esto se puede evitar enjuagando con un gran volumen de agua durante la eliminación.
7. Para poder obtener resultados correctos, es esencial conservar y diluir correctamente las heces. La inoculación de una cantidad excesiva de heces en el diluyente de la muestra puede restringir el flujo dentro del dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB, y los resultados no serían válidos. Si las heces no se almacenan correctamente o no se inculca una cantidad suficiente en el diluyente de la muestra, se pueden obtener resultados falsos negativos.
8. Si el envase primario está dañado (bolsa de papel de aluminio o frasco de tampón de dilución), debe desecharse el producto sin usar.
9. No use este producto si aparece una línea de color en el área de resultados de cualquier tira antes de empezar a usarlo.
10. Si se almacena refrigerado, deje que todos los componentes del kit y las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente, ya que las muestras o los reactivos fríos pueden afectar al desarrollo de la prueba.
11. No deseché la caja del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. Esta caja lleva información esencial sobre la marca CE del producto y el número de lote.
12. El producto usado debe desecharse de conformidad con la normativa local vigente.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO

Almacene el kit Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB a una temperatura de 2-30 °C cuando no lo use. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del kit.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Deje que los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (19-27 °C) antes de hacer una prueba, ya que las muestras o los reactivos fríos pueden reducir la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden tardar hasta 60 minutos en atemperarse tras haber estado refrigerados.
2. Las heces deben mezclarse bien (independientemente de su consistencia) para garantizar que la muestra sea representativa antes de obtenerla.
3. Cuando dispense las gotas, mantenga los viales de los reactivos en posición vertical para garantizar la uniformidad del tamaño de las gotas y de la dispensación.
4. En ocasiones, puede haber partículas que interfieran con el flujo de la muestra. Si el dispositivo de prueba no absorbe rápidamente la muestra diluida, toque con suavidad la parte inferior del puerto de muestreo con una varilla aplicadora para mover una posible partícula fecal sólida que pudiera estar impidiendo la absorción. Otra posibilidad es extraer una nueva alícuota de la muestra del diluyente y volver a analizarla. Las muestras diluidas que contengan muchas partículas pueden centrifugarse (1-5 minutos a 700 G) o dejarse reposar durante 3-5 minutos antes de continuar.
5. Asegúrese de obtener la cantidad adecuada de muestra: unos 110 mg para muestras sólidas (una pequeña porción de unos 5 mm de diámetro). Si la muestra es semilíquida (no se puede pipetear), tome una cantidad de muestra suficiente como para cubrir las muescas de la varilla que lleva la tapa del frasco. Si la muestra es líquida, tome 110 µL (4 gotas si se utilizan las pipetas desechables suministradas con el kit). Estas cantidades se pasan al tampón de dilución de la muestra que viene en los frascos incluidos en el kit. Si la cantidad de muestra es mayor de lo indicado anteriormente, puede que la cromatografía no funcione correctamente; esto es especialmente importante en el caso de las muestras sólidas, ya que no es fácil extraer la cantidad de muestra recomendada.
6. No olvide añadir el volumen correcto de la muestra extraída a los dos puertos de muestreo marcados con una flecha en el dispositivo de plástico. Si el volumen es inferior al indicado, es posible que la muestra no fluya porque no llegue suficiente cantidad de ella a las tiras de reacción; si el volumen es mayor, pueden aparecer líneas marrones en lugar de las esperadas (véase la figura 1).

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos se suministran listos para usar. Deje que los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (19-27 °C) antes de usarlos. Mezcle con suavidad el reactivo líquido antes de usarlo. No abra la bolsa del dispositivo hasta que esté listo para hacer el análisis.

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La prueba se ha validado para muestras frescas sin tratar. No utilice muestras guardadas en medios de transporte o con conservantes (formalina, SAF, PVA o similares) o medios de enriquecimiento añadidos, ya que su presencia podría interferir con el correcto desarrollo de la prueba.

Las muestras de heces deben transportarse en un recipiente hermético. Conviene analizar la muestra lo antes posible, pero se puede mantener a 2-8 °C un máximo de 2 días antes de analizarla. Si no se pueden analizar en este plazo de tiempo, las muestras deben congelarse en cuanto se reciban y conservarse congeladas (-20 °C) hasta el momento de analizarlas. Las muestras se pueden congelar y descongelar dos veces. Procure que las muestras hayan alcanzado la temperatura ambiente antes de hacer la prueba.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

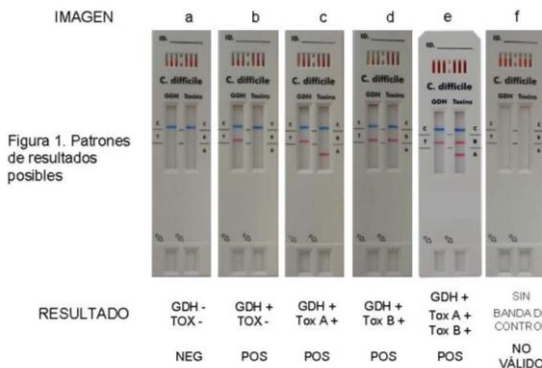
Lleve todas las tarjetas de análisis, los diluyentes de las muestras y las muestras a temperatura ambiente (19-27 °C) antes del análisis. Saque los reactivos de la caja del kit para que se calienten. Los reactivos pueden tardar hasta 60 minutos en atemperarse tras haber estado refrigerados.

1. Etiquete un frasco de diluyente de la muestra para cada muestra de paciente que se vaya a analizar.
2. Desenrosque la tapa del frasco con cuidado para no derramar el tampón de dilución de la muestra.
3. Añada inmediatamente la muestra de heces o los controles como se indica a continuación:
 - a. Heces formadas/sólidas: mezcle muy bien la muestra de heces. Utilizando la varilla que lleva la tapa del frasco, recoja una pequeña porción de 5 mm de diámetro.
 - b. Heces semisólidas: mezcle muy bien la muestra de heces. Usando la varilla que lleva la tapa del frasco, recoja una cantidad de muestra que cubra completamente las ranuras de la varilla.
 - c. Heces líquidas: usando las pipetas desechables que vienen en el kit, mezcle bien la muestra de heces, aspire y dispense en el frasco 4 gotas de heces (correspondientes a un volumen de 110 µL).

- d. Control externo positivo o negativo: consulte las instrucciones de uso del JUEGO DE CONTROLES EXTERNOS.
4. Añada cuidadosamente la muestra al frasco del tampón de dilución correspondiente. Enrosque la tapa bien apretada y agite con fuerza para homogeneizar la mezcla.
5. Utilice 1 tarjeta de análisis Immunocard STAT! para cada muestra o control. Cuando esté listo para hacer la prueba, saque la tarjeta de análisis de la bolsa de papel de aluminio. Deseche la bolsa y el desecante. Etiquete el dispositivo con el nombre del paciente o del control.
6. Rompa la parte superior de la tapa del frasco usando un trozo de papel para evitar fugas.
7. Coloque el frasco invertido en posición vertical y añada 4 gotas de la muestra diluida en el puerto de muestreo de cada tira (ventanas rectangulares marcadas con una flecha).
8. Incube la tarjeta de análisis a 19-27 °C durante 15 minutos.
9. Al final de la incubación, lea visualmente los resultados de cada tarjeta antes de que hayan pasado 30 segundos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El casete contiene dos tiras: la tira para GDH en el lado izquierdo, y la tira para las toxinas A y B en el lado derecho. Los resultados posibles se ilustran en la figura 1.



RESULTADOS NEGATIVOS: Una banda **AZUL** en la posición de la línea de control (C). No aparece ninguna otra banda en las dos tiras del casete. Un resultado negativo en la tira del antígeno de GDH indica que no hay antígenos de *C. difficile* en la muestra o que están por debajo del límite de detección del ensayo.

Un resultado negativo en la tira de toxinas indica que no hay toxinas de *C. difficile* en la muestra o que están por debajo del límite de detección del ensayo.

RESULTADOS POSITIVOS PARA GDH: Una banda **ROSADA-ROJA** en la posición de la línea analítica (T), en presencia de una banda **AZUL** en la posición de la línea de control (C) de la TIRA IZQUIERDA del casete. Un resultado positivo indica la presencia de *C. difficile* en la muestra.

RESULTADOS POSITIVOS PARA LAS TOXINAS: Una banda **ROSADA-ROJA** en la posición de la línea de la TOXINA A (A) y/o la TOXINA B (B), en presencia de una banda **AZUL** en la posición de la línea de control (C) de la TIRA DERECHA del casete. Un resultado positivo indica la presencia de toxina(s) de *C. difficile*.

RESULTADOS NO VÁLIDOS:

- No aparece la banda **AZUL** en la posición correspondiente a la línea de control (C) de alguna tira. La prueba no es válida porque la ausencia de una banda de control indica que el procedimiento analítico no se ha desarrollado correctamente o que los reactivos se han estropeado. Para comunicar un resultado válido, deben aparecer las bandas de color **AZUL** de ambas tiras.
- Aparece una banda **ROSADA-ROJA** en la posición de la línea de GDH, toxina A o toxina B del dispositivo **después** del límite de incubación de 15 minutos o una banda de **cualquier color que no sea ROSADO-ROJO**. Si las pruebas se incuban durante demasiado tiempo, pueden obtenerse resultados falsos positivos. Las bandas con colores distintos del rosado-rojo pueden indicar una interferencia o un deterioro de los reactivos.

Si aparece algún resultado difícil de interpretar, se puede repetir la prueba con la misma muestra. Obtenga una nueva muestra y repita el análisis si la muestra original produce resultados ilegibles repetidas veces.

Un pequeño porcentaje de las muestras pueden dar negativo para el antígeno pero positivo para una o ambas toxinas. Estas muestras deben volver a analizarse utilizando una muestra nueva. Si los resultados de la nueva muestra son negativos para el antígeno pero positivos para alguna toxina, comunique el resultado como positivo para la(s) toxina(s).

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo y los controles de calidad deben ser realizados siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

Los componentes del kit deben examinarse visualmente cada vez que se vayan a usar para detectar signos evidentes de contaminación microbiana, congelación, fugas o cualquier deterioro.

CONTROLES INTERNOS: Los controles internos se encuentran dentro de la tira reactiva, por lo que se evalúan con cada prueba.

- Las bandas de color **AZUL** que aparecen en las posiciones de las líneas de control sirven de control del procedimiento, e indican que la prueba se ha realizado correctamente, con un flujo adecuado y unos reactivos analíticos con capacidad de reaccionar en el momento de usarse.
- Un fondo limpio alrededor de las líneas de control y analíticas también sirve como control del procedimiento. Un fondo de un color oscuro en las líneas de control o analíticas puede invalidar la prueba, y puede ser indicativo de un deterioro de los reactivos, del uso de una muestra inadecuada o de un mal desarrollo de la prueba.

CONTROLES EXTERNOS: Con cada nuevo lote o envío de kits deben analizarse controles positivos y negativos. El número de pruebas realizadas con los controles externos viene determinado por los requisitos de las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales. Para controlar la reactividad de los reactivos y el desarrollo de la prueba se utilizan controles externos. El hecho de que los controles no produzcan los resultados esperados puede significar que alguno de los reactivos o componentes ya no tiene capacidad de reacción en el momento de usarse, que la prueba no se ha realizado correctamente o que no se han añadido los reactivos o las muestras.

Los resultados esperados con los controles se describen en el apartado INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS. Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. El kit no debe utilizarse si los análisis de los controles no producen los resultados correctos.

VALORES ESPERADOS

La frecuencia de la diarrea postantibiótica causada por *C. difficile* depende de varios factores, incluyendo la población de pacientes, el tipo de institución y la epidemiología. La incidencia comunicada de la enfermedad asociada a *C. difficile* en pacientes sospechosos de tener enfermedades relacionadas con antibióticos es del 15-20 %, aunque en diferentes centros se pueden encontrar tasas positivas superiores o inferiores a estos márgenes.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 1. La finalidad del ensayo es confirmar la presencia del antígeno común de GDH y de toxinas en las heces del paciente. Un resultado negativo de la prueba no excluye completamente una infección por una cepa toxigénica de *C. difficile*. Los resultados de los análisis deben utilizarse junto con la información del paciente obtenida a través de la evaluación clínica u otros procedimientos de diagnóstico.
- 2. La prueba es cualitativa, y no se debe hacer una interpretación cuantitativa basada en la intensidad de la línea positiva al comunicar los resultados.
- 3. La prueba está pensada para usarse con heces humanas frescas; no se ha validado ningún otro tipo de muestra.
- 4. Una buena conservación de las heces es esencial para poder obtener resultados fiables. La degradación de la muestra puede dar lugar a un resultado negativo falso. Aunque son relativamente estables a 2-8 °C, las toxinas de *C. difficile* se degradan fácilmente a temperatura ambiente, especialmente cuando su concentración es baja. La velocidad a la que las toxinas se degradan difiere de una muestra de paciente a otra y, por lo tanto, no se puede predecir. Por esta razón, las mejores prácticas requieren que, una vez obtenidas, las muestras se refrigieren o se congelen antes de dos horas, y que se analicen en los plazos recomendados en este prospecto. No acepte muestras que no hayan sido obtenidas, manipuladas o transportadas correctamente.
- 5. Se han identificado dos grupos distintos que pueden albergar tasas muy elevadas de *C. difficile* de forma asintomática. Se han descrito tasas de colonización de hasta el 50 % o más en bebés y tasas de hasta el 32 % en pacientes con fibrosis quística.
- 6. Si no se añade la cantidad correcta de heces al frasco del diluyente de la muestra, se pueden obtener resultados falsos negativos o positivos.
- 7. Una incubación excesiva de las pruebas puede dar lugar a resultados falsos positivos. La incubación de las pruebas a una temperatura baja o durante un tiempo corto puede dar lugar a resultados falsos negativos.
- 8. Las muestras con hemorragia intensa pueden interferir con el ensayo, produciendo un resultado negativo falso o la aparición de bandas inespecíficas. Esto suele ir acompañado de una alteración del color de las bandas. No comunique ningún resultado si las bandas no son del color correcto (las líneas de control deben ser de color AZUL, las líneas analíticas deben ser de color ROSADO-ROJO); véase la figura 1.
- 9. Los estudios de reactividad cruzada han puesto de manifiesto que las muestras de heces fuertemente positivas para *E. histolytica* podrían interferir con los resultados y dar un resultado positivo débil para la toxina B.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El rendimiento clínico de Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB se ha evaluado en un total de 142 muestras de GDH y 138 de toxinas A y B. Las muestras se obtuvieron de forma retrospectiva y se conservaron congeladas. Las muestras se caracterizaron utilizando un ELISA comercial para GDH y para las TOXINAS A y B. Los resultados comparativos de Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB se indican a continuación:

Immunocard STAT! <i>C. difficile</i> GDH-AB TIRA DE GDH			
MÉTODO DE REFERENCIA: ELISA	POS	NEG	TOTAL
POSITIVO	38	2	40
NEGATIVO	1	101	102
Total	39	103	142
		%	IC 95 %
Sensibilidad clínica - concordancia positiva	38/40	95,0	83,5-98,6
Especificidad clínica - concordancia negativa	101/102	99,0	94,6-99,8
Valor predictivo positivo (VPP)	38/39	97,4	86,8-99,5
Valor predictivo negativo (VPN)	101/103	98,1	93,1-99,5
Immunocard STAT! <i>C. difficile</i> GDH-AB TOXINAS A y B			
MÉTODO DE REFERENCIA: ELISA	POS	NEG	TOTAL
POSITIVO*	35	2	37
NEGATIVO	0	101	101
Total	35	103	138
		%	IC 95 %
Sensibilidad clínica - concordancia positiva	36/38	94,6	82,3-98,5
Especificidad clínica - concordancia negativa	101/101	100	94,3-100
Valor predictivo positivo (VPP)	35/35	100	90-100
Valor predictivo negativo (VPN)	101/103	98,1	93,2-99,5

*RESULTADOS POSITIVOS confirmados por CCTNA (ensayo de citotoxicidad celular y neutralización)

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

El límite de detección (LD) del ensayo se ha determinado de la siguiente manera:

- Ensayo de GDH: para determinar el valor del LD se utilizaron dos preparados diferentes de glutamato deshidrogenasa (nativa y recombinante) de *C. difficile*. Con ambos preparados se obtuvo un valor medio de 0,8 ng/mL.
- Ensayo de TOX A y B: se utilizaron toxinas A y B de diferentes fuentes (List Biological Laboratories, tgc BIOMiCs y The Native Antigen) para determinar el valor de LD. Se obtuvieron unos valores medios de 12,5 ng/mL para la toxina A y 1,5 ng/mL para la toxina B.

También se determinó el LD inferior de la prueba utilizando muestras de heces reales como matriz. Los valores fueron coherentes con los obtenidos como se ha descrito más arriba.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB se determinó utilizando un único lote de ensayo.

PRECISIÓN INTERDIARIA

Para medir la precisión interdiaria, se prepararon diluciones seriadas (curvas de sensibilidad) de cada analito. Los análisis los hizo el mismo técnico en cuatro días distintos, con una concordancia en los resultados del 100 %.

PRECISIÓN ENTRE TÉCNICOS

Para determinar la precisión entre técnicos, se usaron diluciones seriadas de cada analito que cinco técnicos analizaron por duplicado el mismo día. Se observaron diferencias, pero en ningún caso superaron un factor de dilución de 2. Las diferencias se consideraron aceptables para una técnica inmunocromatográfica cualitativa.

Utilizando un único lote de ensayo, se hicieron mediciones para obtener una curva de sensibilidad de cada analito durante cuatro días espaciados en el tiempo. Se obtuvo la misma sensibilidad para la GDH y para las toxinas A y B.

PRECISIÓN ENTRE TÉCNICOS:

Cinco técnicos midieron por duplicado una curva de sensibilidad para cada analito. Se observaron diferencias, pero en ningún caso superaron un factor de dilución de 2.

PRECISIÓN ENTRE LOTES:

Se usaron tres lotes diferentes de Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB para medir la curva de sensibilidad por duplicado. El análisis lo hizo una sola persona el mismo día. Se observaron diferencias de un factor de dilución de 2, que se consideran aceptables y tolerables para esta prueba.

Las diferencias observadas en los apartados de "Reproducibilidad" son aceptables considerando la variabilidad inherente a una técnica inmunocromatográfica cualitativa.

EFFECTO PROZONA/GANCHO

Se han analizado concentraciones muy altas de los tres analitos detectados por el ensayo sin que se observe ninguna disminución en la intensidad de las señales positivas. Estos valores de concentración (superiores a los valores máximos que se pueden encontrar entre la población) son los siguientes:

- GDH: 4000 ng/mL, aproximadamente 1000 veces el LD del ensayo.
- Toxina A: 5000 ng/mL, aproximadamente 400 veces el LD del ensayo.
- Toxina B: 5000 ng/mL, aproximadamente 1500 veces el LD del ensayo.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las sustancias indicadas en el cuadro siguiente no interfieren con los resultados de la prueba cuando se añaden a las muestras de heces (positivas y negativas) a las concentraciones especificadas:

Racecadotril	5 % {p/v}	Ibuprofeno	20 % {p/v}
Cimetidina	10 % {p/v}	Ácido acetilsalicílico	30 % {p/v}
Loperamida	5 % {p/v}	Edulcorante artificial	5 % {p/v}
Metronidazol	10 % {p/v}	Ácido palmítico	40 % {p/v}
Omeprazol	3 % {p/v}	Sulfato de bario	5 % {p/v}
Ampicilina	15 % {p/v}	Mucina	5 % {p/v}

REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluó la reactividad cruzada del ensayo para detectar diferentes bacterias que pueden estar presentes en el tracto intestinal.

El ensayo se utilizó para analizar muestras de heces reales que se sabía que eran fuertemente positivas para las siguientes bacterias/virus y parásitos:

Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - *Helicobacter pylori* - *Entamoeba histolytica* - *Giardia lamblia* - *Cryptosporidium parvum*

Se ha registrado una reacción cruzada con heces que contienen *Entamoeba histolytica*. Cuando la prueba se utiliza en el parásito aislado (sin la matriz de las heces), no se detecta ninguna reacción cruzada. Véanse en el punto 9 las limitaciones del procedimiento.

Además, las muestras de heces inoculadas con los siguientes agentes microbianos (hasta una concentración final en la muestra de ~1 x 10⁸ organismos/mL) no reaccionan con el ensayo:

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

Se puede obtener información adicional sobre las características de rendimiento de este producto contactando con el Departamento de Asistencia Técnica de Meridian en las direcciones que se indican más abajo.

immunocard STAT!

C. difficile GDH-AB

Schneller, einstufiger Immunoassay für den simultanen Nachweis von dem *Clostridium difficile* Antigen Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und der Toxine A und B in humanen Stuhlproben

REF 750520

IVD

VERWENDUNGSZWECK

Der Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test ist ein qualitativer, immunochromatographischer Schnelltest für den zeitgleichen Nachweis des Antigens Glutamat-Dehydrogenase von *Clostridium difficile* (GDH, wird von toxischen wie nicht-toxischen Stämmen produziert) sowie der von *Clostridium difficile* erzeugten Toxine A und B.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Clostridium difficile ist ein zur Sporenbildung fähiges, gram-positives, anaerobes Bakterium, das symptomfrei in bis zu 5 % der gesunden Bevölkerung vorhanden sein kann.¹ Toxische Stämme von *Clostridium difficile* sind die häufigste Ursache für nosokomiale infektiöse Diarrhö in entwickelten Ländern und ist in rund 25 % aller Fälle der Krankheitserreger bei Antibiotika-assoziierten Diarrhö.² Allein in US-amerikanischen Krankenhäusern werden jährlich schätzungsweise 300.000 Fälle von C. difficile-Infektionen (CDI) beobachtet.^{1, 2} Praktisch jedes Antibiotikum kann einen Patienten für CDI prädisponieren. Das Krankheitsbild einer CDI reicht von einer symptomfreien Besiedelung bis hin zu lebensbedrohlicher pseudomembranöser Kolitis und toxischem Megakolon.² Die pathogenen Stämme von C. difficile produzieren mindestens eines von zwei biologisch und immunologisch unterschiedlichen Toxinen³: Toxin A (Enterotoxin) und Toxin B (Zytotoxin); diese sind die hauptsächlichen Virulenzfaktoren für die klinischen Anzeichen der Erkrankung.

Glutamat-Dehydrogenase (GDH) ist ein Enzym, das von toxischen und nicht-toxischen Stämmen von C. difficile in großen Mengen produziert wird. Es ist daher ein ausgezeichneter Marker für das Vorhandensein des Mikroorganismus selbst.⁴

Die Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), die Infectious Diseases Society of America (IDSA) und die Europäische Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (ESCMID) empfehlen unterschiedliche Testmethoden für den Nachweis von toxischen C. difficile im Labor⁵, etwa verschiedene Kombinationen von GDH-, Toxin- und NAAT-Assays. Nach einem aktuell empfohlenen mehrstufigen Algorithmus sollte eine Probe in einem ersten Screening auf GDH untersucht werden; bei einem positivem Ergebnis wird mit einem zweiten Test die Toxizität des Stammes nachgewiesen, da nur die toxischen und pathologischen Stämme des Mikroorganismus Toxine produzieren. Mit dem Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test können Labore diesen Ansatz übernehmen und dabei mit einem einstufigen Assay beide Ergebnisse gleichzeitig erhalten.

Ein positives Testergebnis auf das Enzym Glutamat-Dehydrogenase von C. difficile bestätigt das Vorhandensein dieses Organismus in einer Stuhlprobe, ein negatives Ergebnis weist auf seine Abwesenheit hin. Ein positives Testergebnis auf die Toxine A und/oder B bestätigt das Vorhandensein eines toxischen Stammes von C. difficile.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Der Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test enthält zwei Streifen in einer Doppelkassette, einen für den Test auf GDH und einen für den Test auf die Toxine A und B:

1. Der GDH-Streifen verwendet eine Kombination aus:
 - a. Rosa-rötlichen Latexpartikeln, konjugiert mit spezifischen Antikörpern gegen von C. difficile produziertes GDH, und GDH-spezifischen Antikörpern, die auf der Testposition unterhalb der Kontrolllinie immobilisiert sind. Falls das Antigen GDH vorhanden ist, wird es während der Inkubation von beiden Antikörpern gebunden, wodurch sich auf der Testposition eine rosa-rötliche Linie entwickelt.
 - b. Blaue Latexpartikeln, konjugiert mit einem Antigen, das durch einen spezifischen Antikörper für dieses Antigen erkannt wird, sind an die Membran gebunden. Dies definiert die Kontrolllinie des Tests.
2. Der Toxinstreifen verwendet eine Kombination aus:
 - a. Rosa-rötlichen Latexpartikeln, konjugiert mit spezifischen Antikörpern gegen Toxin B, und für Toxin B spezifischen Antikörpern, die auf der B-Position unterhalb der Kontrolllinie immobilisiert sind. Falls Toxin B vorhanden ist, wird es während der Inkubation von beiden Antikörpern gebunden, wodurch sich auf der B-Position eine rosa-rötliche Linie entwickelt.
 - b. Rosa-rötlichen Latexpartikeln, konjugiert mit spezifischen Antikörpern gegen Toxin A, und für Toxin A spezifischen Antikörpern, die auf der A-Position unterhalb der Toxin-B-Linie immobilisiert sind. Falls Toxin A vorhanden ist, wird es während der Inkubation von beiden Antikörpern gebunden, wodurch sich auf der A-Position eine rosa-rötliche Linie entwickelt.
 - c. Blaue Latexpartikeln, konjugiert mit einem Antigen, das durch einen spezifischen Antikörper für dieses Antigen erkannt wird, sind an die Membran gebunden. Dies definiert die Kontrolllinie des Tests.

Die verdünnte Stuhlprobe eines Patienten wird in beide Probenöffnungen der Kassette gegeben und migriert entlang der Membranen durch die Test- und die Kontrollzonen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur weist das Erscheinen einer spezifisch gefärbten Linie im Lesefenster neben dem entsprechenden Buchstaben bei Vorhandensein der Kontrolllinie ein positives Ergebnis aus (siehe Abb. 1).

REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.

1. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB-Testvorrichtung: Zwei reaktive Streifen in einem Kunststoffgehäuse, verpackt in einem Folienbeutel mit Trockenmittel.
2. Flaschen mit Probenverdünnungspuffer: Gepufferte Lösung mit 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Der Verdünnungspuffer wird in einem Einweg-Tropffläschchen aus Kunststoff mit Applikatorstäbchen geliefert. Er ist gebrauchsfertig.
3. Einweg-Transferpipetten.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Externes Kontrollset mit Positiv- und Negativkontrollen. Meridian Bestell- Nr. 750501
2. Vortexmischer
3. Intervall-Stoppuhr

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Von der hier beschriebenen Methode nicht abweichen, da dies falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zur Folge haben könnte. Sobald der Test gestartet wurde, führen Sie alle weiteren Schritte ohne Unterbrechung durch.
3. Patientenproben und gebrauchte Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB-Testvorrichtungen können infektiöse Erreger enthalten und müssen gemäß biologischer Sicherheitsstufe 2 wie im CDC/NIH-Handbuch „Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories“ empfohlen wird, gehandhabt werden.
4. Tauschen Sie die Reagenzien unterschiedlicher Kit-Chargennummern nicht aus, verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
5. Verwenden Sie den Probenverdünnungspuffer nicht, wenn Anzeichen auf eine Kontamination oder Präzipitation vorliegen.
6. Der Probenverdünnungspuffer enthält Natriumazid und damit eine hautreizende Substanz. Vermeiden Sie einen Kontakt der Haut mit den Reagenzien. Eine Entsorgung von Reagenzien mit Natriumazid in Blei- oder Kupferrohre kann zur Bildung explosiver Metallazide führen. Dies kann durch Spülen mit großen Mengen Wasser während einer derartigen Entsorgung vermieden werden.
7. Eine ordnungsgemäße Lagerung und Verdünnung der Stuhlproben ist wesentlich, um korrekte Ergebnisse zu gewährleisten. Ein Überbeimpfen von Stuhlproben in den Probenverdünnungspuffer kann den Fluss innerhalb der Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB-Testvorrichtung behindern und zu ungültigen Ergebnissen führen. Eine nicht ordnungsgemäße Lagerung von Stuhlproben oder eine Unterbeimpfung in den Probenverdünnungspuffer können falsch negative Ergebnisse zur Folge haben.
8. Bei beschädigter Primärverpackung (Folienbeutel oder Fläschchen des Verdünnungspuffers) muss das Produkt entsorgt und darf nicht verwendet werden.
9. Dieses Produkt darf nicht verwendet werden, wenn im Ergebnisbereich eines der Teststreifen vor Testbeginn eine farbige Linie erscheint.
10. Falls der Test gekühlt gelagert wird, sollten die Komponenten des Kits und die Stuhlproben vor Testbeginn Raumtemperatur erreichen, da kalte Reagenzien und/oder Proben die Funktionalität des Tests beeinträchtigen können.
11. Die Kitpackung erst entsorgen, wenn der gesamte Inhalt aufgebraucht ist. Diese Packung enthält wichtige Informationen zur CE-Kennzeichnung des Produkts und zur Chargennummer.
12. Das verwendete Produkt sollte gemäß den geltenden lokalen Richtlinien entsorgt werden.

GEFAHREN- UND SICHERHEITSHINWEISE

Es gibt keine bekannten Gefahren, die mit diesem Produkt verbunden sind.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB-Kit bei 2–30 °C aufbewahren, wenn es nicht in Gebrauch ist. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben.

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

1. Vor der Durchführung eines Tests die Kitkomponenten und Proben auf Raumtemperatur (19–27 °C) erwärmen lassen, da kalte Reagenzien und/oder Proben die Testempfindlichkeit reduzieren können. Es kann bis zu 60 Minuten dauern, bis die Reagenzien nach der Kühlung aufgewärmt sind.
2. Die Stuhlproben müssen vor der Probenahme gründlich gemischt werden (unabhängig von der Konsistenz), um die Repräsentativität der Probe zu gewährleisten.
3. Halten Sie die Reagenzröhrchen bei der Abgabe von Tropfen vertikal, um eine gleichförmige Tropfengröße und Abgabe zu gewährleisten.
4. Gelegentlich können Partikel den Probenfluss beeinträchtigen. Wenn die Testvorrichtung die verdünnte Probe nicht ohne Weiteres absorbiert, berühren Sie die Innenseite der Probenöffnung vorsichtig mit einem Applikatorstäbchen, um die festen Stuhlpartikel zu bewegen, die die Absorption verhindern. Alternativ kann ein neues Aliquot der Probe aus dem Verdünnungspuffer entnommen und erneut getestet werden. Verdünnte Proben, die eine hohe Partikelkonzentration enthalten, können zentrifugiert (1–5 Minuten bei 700 x g) oder für 3–5 Minuten stehen gelassen und erst dann weiter bearbeitet werden.
5. Achten Sie darauf, dass eine geeignete Probenmenge entnommen wird: etwa 110 mg bei festen Proben (eine kleine Menge mit etwa 5 mm Durchmesser). Falls die Probe halbfüssig ist (und nicht mit der Pipette aufgezogen werden kann), nehmen Sie eine ausreichende Menge, um die Furchen des am Fläschchendeckel befestigten Stäbchens zu bedecken. Nehmen Sie bei flüssigen Proben 110 µL (4 Tropfen, falls Sie die mit dem Kit gelieferten Einwegpipetten verwenden). Diese Probenmengen werden in den Probenverdünnungspuffer extrahiert, der in den im Kit enthaltenen Fläschchen geliefert wird. Falls die Probenmenge diese Angaben übersteigt, kann dies eine korrekte Ausführung der Chromatographie behindern; dies ist besonders kritisch bei festen Stuhlproben, da die Gewinnung der empfohlenen Probenmenge schwierig ist.
6. Achten Sie darauf, ein korrektes Volumen der extrahierten Probe in die beiden Probenöffnungen zu überführen; die auf der Kunststoffvorrichtung mit einem Pfeil markiert sind. Ist das Volumen geringer als angegeben, fließt die unzureichende Probenmenge möglicherweise nicht bis zu den Reaktionsstreifen; bei höherem Volumen können anstelle der erwarteten Linien braune Linien erscheinen (siehe Abb. 1).

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert. Vor der Verwendung die Kitkomponenten und Proben auf Raumtemperatur (19–27 °C) erwärmen lassen. Das flüssige Reagenz vor der Verwendung vorsichtig mischen. Den Beutel mit der Testvorrichtung erst unmittelbar vor der Testdurchführung öffnen.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Der Test ist für frische unbehandelte Proben validiert. Verwenden Sie keine in Transportmedien gesammelte Proben, denen Konservierungsmittel zugesetzt wurden (etwa Formalin, SAF, PVA oder ähnliche Substanzen) oder die Anreicherungsmedien enthalten, da diese Substanzen die fehlerfreie Testdurchführung behindern könnten.

Die Stuhlproben sollten in einem luftdichten Behälter transportiert werden. Die Proben sollten so bald wie möglich getestet werden, können aber vor dem Testen bei Kühlung (–2–8 °C) bis zu 2 Tage gelagert werden. Falls der Test nicht innerhalb dieses Zeitrahmens durchgeführt werden kann, müssen die Proben unmittelbar nach ihrem Eingang eingefroren und bis zum Testen tiefgekühlt (–20 °C) aufbewahrt werden. Die Proben können zwei Mal eingefroren und aufgetaut werden. Vergewissern Sie sich vor dem Testen, dass die Proben sich auf Raumtemperatur erwärmt haben.

TESTDURCHFÜHRUNG

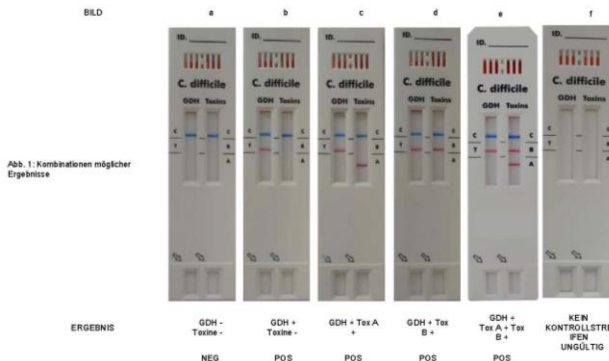
Bringen Sie vor dem Testen alle Testkarten, den Probenverdünnungspuffer und die Proben auf Raumtemperatur (19–27 °C). Entnehmen Sie dafür die Reagenzien aus der Kitpackung, damit diese sich erwärmen können. Es kann bis zu 60 Minuten dauern, bis die Reagenzien sich nach der Kühlung aufgewärmt sind.

1. Beschriften Sie für jede zu testende Patientenprobe ein Fläschchen des Probenverdünnungspuffers.
2. Schrauben Sie den Deckel vorsichtig vom Fläschchen ab, um die Pufferlösung zur Probenverdünnung nicht zu verschütten.
3. Fügen Sie die Stuhlproben oder Kontrollen sofort folgendermaßen hinzu:
 - a. Geformte/feste Stühle: Mischen Sie die Stuhlprobe gründlich. Gewinnen Sie mithilfe des am Fläschchendeckel befestigten Stäbchens eine kleine Menge von 5 mm Durchmesser.

- b. Halbfeste Stühle: Mischen Sie die Stuhlprobe gründlich. Gewinnen Sie mithilfe des am Fläschchendeckel befestigten Stäbchens eine ausreichende Probenmenge, um die Furchen des Stäbchens vollständig zu bedecken.
- c. Flüssige Stühle: Mischen Sie die Stuhlprobe unter Verwendung der im Kit enthaltenen Einwegpipetten gründlich. Entnehmen und überführen Sie 4 Tropfen der Stuhlprobe (entsprechend einem Volumen von 110 µL) in das Fläschchen.
- d. Externe Positiv- oder Negativkontrolle: Gehen Sie nach der Gebrauchsanweisung des EXTERNEN KONTROLLSETS vor.
4. Fügen Sie die Probe sorgfältig dem entsprechenden Fläschchen mit dem Verdünnungspuffer hinzu. Schrauben Sie den Deckel fest und schütteln Sie das Fläschchen kräftig, um eine homogene Mischung zu erhalten.
5. Verwenden Sie 1 Immunocard STAT! Testkarte pro Probe oder Kontrolle. Wenn Sie zur Durchführung des Tests bereit sind, entnehmen Sie die Testkarte aus dem Folienbeutel. Entsorgen Sie den Beutel und das Trocknungsmittel. Beschriften Sie die Testvorrichtung mit dem Namen des Patienten bzw. der Kontrolle.
6. Brechen Sie den Fläschchendeckel oben ab und verwenden Sie dabei ein Stück Papier, um ein Austreten von Flüssigkeit zu verhindern.
7. Drehen Sie das Fläschchen um, wobei es in vertikaler Position verbleibt, und geben Sie 4 Tropfen der verdünnten Probe in die Probenöffnung (rechteckiges, mit Pfeil markiertes Fenster) eines jeden Streifens.
8. Inkubieren Sie die Testkarte bei 19–27 °C für eine Dauer von 15 Minuten.
9. Lesen Sie die Ergebnisse der Karten nach Inkubationsende innerhalb von 30 Sekunden visuell ab.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Kassette enthält zwei Teststreifen: auf der linken Seite den Streifen für GDH und auf der rechten Seite den Streifen für die Toxine A und B. Die möglichen Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt.



NEGATIVE ERGEBNISSE: Eine **BLAUE** Linie auf Höhe der Kontrolllinie (C). Keine weiteren Linien auf beiden Streifen der Kassette.

Ein negatives Ergebnis auf dem Streifen für das GDH-Antigen bedeutet, dass das Antigen von *C. difficile* in der Probe entweder gar nicht oder in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Assays vorliegt.

Ein negatives Ergebnis auf dem Toxinstreifen bedeutet, dass die Toxine von *C. difficile* in der Probe entweder gar nicht oder in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Assays vorliegen.

POSITIVE ERGEBNISSE FÜR GDH: EINE **ROSA-rötliche** Linie auf der Höhe der Testlinie (T) bei Vorhandensein einer **BLAUE** Linie auf der Höhe der Kontrolllinie (C) auf dem LINKEN STREIFEN der Kassette. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein von *C. difficile* in der Probe hin.

POSITIVE ERGEBNISSE FÜR TOXINE: EINE **ROSA-rötliche** Linie auf der Höhe der Testposition für TOXIN A (A) und/oder TOXIN B (B) bei Vorhandensein einer **BLAUE** Linie auf der Höhe der Kontrolllinie (C) auf dem RECHTEN STREIFEN der Kassette. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein der Toxine von *C. difficile* hin.

UNGÜLTIGE ERGEBNISSE:

- Das Fehlen einer **BLAUE** Linie auf der Höhe der Kontrolllinie (C) auf einem oder beiden Teststreifen. Das Ausbleiben der Kontrolllinie weist darauf hin, dass der Test fehlerhaft durchgeführt wurde oder ein Zerfall der Reagenzien aufgetreten ist. Der Test ist somit ungültig. Der Test ergibt nur dann ein gültiges Ergebnis, wenn auf beiden Teststreifen die **BLAUE** Kontrolllinien zu sehen sind.
- Eine **ROSA-rötliche** Linie auf der Höhe der Testpositionen für GDH, Toxin A oder Toxin B **nach Ablauf** der definierten Inkubationszeit von 15 Minuten, oder eine Linie in einer anderen Farbe als **ROSA-rötlich**. Bei zu langer Inkubationsdauer können falsch positive Ergebnisse auftreten. Linien in anderen Farben als rosa-rötlich können auf einen Zerfall von Reagenzien oder eine Beeinträchtigung hindeuten.

Sollte die Auswertung der Ergebnisse schwierig sein, kann der Test mit derselben Probe wiederholt werden. Wenn die ursprüngliche Probe wiederholt nicht auswertbare Ergebnisse erbringt, gewinnen Sie eine neue Probe und führen Sie den Test erneut durch.

In seltenen Fällen wird eine Probe negativ auf das Antigen, jedoch positiv auf das(die) Toxin(e) getestet. Diese Tests müssen mit einer frischen Probe wiederholt werden. Falls auch die neue Probe negativ auf das Antigen, jedoch positiv auf das(die) Toxin(e) getestet wird, ist das Ergebnis als positiv auf das(die) Toxin(e) zu berichten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Führen Sie den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.

Die Kitkomponenten müssen zum Zeitpunkt der jeweiligen Verwendung visuell auf offensichtliche Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination, Einfrieren, Auslaufen oder Beschädigung untersucht werden.

INTERNE KONTROLLEN: Interne Kontrollen sind im Teststreifen enthalten und werden daher bei jedem Test evaluiert.

- Die **BLAUE** Kontrolllinien auf Höhe von Position „C“ dienen der Verfahrenskontrolle. Ihr Vorhandensein bedeutet, dass der Test korrekt durchgeführt wurde, dass der Probenfluss ordnungsgemäß erfolgte, und dass die Testreagenzien zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv waren.
- Auch ein sauberer Hintergrund rund um die Kontroll- und Testlinien dient als Verfahrenskontrolle. Wenn die Kontroll- oder Testlinien von dunkler Hintergrundfarbe verdeckt werden, kann dies den Test ungültig machen und ein Hinweis darauf sein, dass die Reagenzien zerfallen sind, eine ungeeignete Probe verwendet wurde oder die Testdurchführung fehlerhaft war.

EXTERNE KONTROLLEN: Mit jeder neuen Kit-Chargennummer oder jeder neuen Lieferung müssen externe Positiv- und Negativkontrollen getestet werden. Die Anzahl der mit den externen Kontrollen durchzuführenden Tests hängt von den Anforderungen der lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen ab. Die Externe Kontrollen dienen zur Überwachung der Reaktivität von Reagenzien und der Testdurchführung. Wenn die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse erbringen, kann dies bedeuten, dass eines der Reagenzien oder eine der Komponenten zum Verwendungszeitpunkt nicht mehr reaktiv war, dass der Test nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde oder dass die Reagenzien oder die Proben nicht hinzugefügt worden sind.

Die für die Kontrollen erwarteten Ergebnisse sind im Abschnitt **AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE** beschrieben. Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, wiederholen Sie als Erstes zur Ermittlung der Fehlerquelle die Kontrolltests. Das Kit sollte nicht verwendet werden, wenn die Kontrolltests nicht die richtigen Ergebnisse erzeugen.

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit des Auftretens von Antibiotika-assoziierten, durch *C. difficile* verursachter, Diarrhö hängt von verschiedenen Faktoren ab, darunter der Patientenpopulation, der Art der Einrichtung und der Epidemiologie. Das gemeldete Vorkommen von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen von Patienten, deren Erkrankung als Antibiotika-assoziiert angenommen wird, liegt bei 15–20 %; dieser Prozentsatz kann in anderen Einrichtungen höher oder niedriger liegen.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Der Assay ist dafür vorgesehen, das Vorhandensein des von allen Stämmen produzierten Antigens GDH und von Toxinen in Stuhlproben von Patienten zu bestätigen. Ein negatives Testergebnis schließt eine Infektion mit einem toxischen *C. difficile*-Stamm nicht vollständig aus. Die Testergebnisse sollten unter Berücksichtigung von Informationen aus der klinischen Evaluierung des Patienten und anderen diagnostischen Verfahren genutzt werden.
2. Es handelt sich um einen qualitativen Test; bei der Auswertung des Ergebnisses kann aus der Farbintensität der positiven Linie keinerlei quantitativer Schluss gezogen werden.
3. Der Test ist zur Verwendung mit humanem Stuhlproben ohne Konservierungsmittel vorgesehen, jegliche andere Probenart wurde nicht validiert.
4. Eine korrekte Konservierung der Stuhlproben ist entscheidend für eine Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Ein Zerfall von Probenmaterial kann falsch negative Ergebnisse verursachen. Die Toxine von *C. difficile* sind bei 2–8 °C relativ stabil, zerfallen aber bei Raumtemperatur leicht, besonders in geringen Konzentrationen. Die Geschwindigkeit dieses Zerfalls ist für jede Patientenprobe unterschiedlich und kann daher nicht prognostiziert werden. Daher erfordert die gute Praxis, Proben innerhalb von zwei Stunden nach der Gewinnung zu kühlen oder einzufrieren und innerhalb des in dieser Gebrauchsanleitung empfohlenen Zeitraums zu testen. Nehmen Sie keine Proben an, die nicht ordnungsgemäß gewonnen, gehandhabt oder transportiert wurden.
5. Es wurden zwei Patientengruppen identifiziert, die zu einem sehr hohen Prozentsatz symptomfrei von *C. difficile* besiedelt sein können. Bei Säuglingen und Kleinkindern wurden Kolonisierungsraten von bis zu 50 % und höher berichtet; bei Patienten mit Mukoviszidose liegt dieser Prozentsatz bei 32 %.
6. Falls dem Fläschchen mit dem Probenverdünnungspuffer nicht die korrekte Menge Stuhl hinzugefügt wird, kann dies falsch negative oder falsch positive Ergebnisse verursachen.
7. Eine Überinkubation von Tests kann falsch positive Ergebnisse erbringen. Die Inkubation von Tests bei niedrigeren Temperaturen oder für einen kürzeren Zeitraum kann falsch negative Ergebnisse ergeben.
8. Hochgradig hämorrhagische Proben können den Test beeinträchtigen und zu falsch negativen Ergebnissen führen oder untypische Linien ergeben. Derartige Fälle gehen oft mit einer Farbveränderung der Linien einher. Falls die Linien nicht die korrekte Farbe aufweisen (Kontrolllinien müssen **BLAU**, Testlinien müssen **ROSA-RÖTLICH SEIN**), DÜRFEN DIE ERGEBNISSE NICHT BERICHTET WERDEN – Siehe Abb. 1.
9. Studien zur Kreuzreaktivität ergaben, dass für *E. histolytica* stark positive Stuhlproben die Ergebnisse beeinträchtigen und ein schwach positives Ergebnis für Toxin B ergeben können.

LEISTUNGSMERKMALE

Die klinische Leistung von dem Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB Test wurde an insgesamt 142 Proben für GDH und 138 Proben für die Toxine A und B evaluiert. Die Proben wurden retrospektiv gewonnen und tiefgeköhlt gelagert. Die Proben wurden mithilfe von kommerziellen ELISA Assays auf GDH und die Toxine A und B untersucht. Die Vergleichsergebnisse für den Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB Test sind nachfolgend zusammengefasst:

		Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB GDH-TESTSTREIFEN		
REFERENZMETHODE: ELISA		POS	NEG	GESAMT
POSITIV		38	2	40
NEGATIV		1	101	102
Gesamt		39	103	142
			%	KI 95 %
Klinische Sensitivität – Positive Übereinstimmung		38/40	95,0	83,5–98,6
Klinische Spezifität – Negative Übereinstimmung		101/102	99,0	94,6–99,8
Positiver prädiktiver Wert (PPV)		38/39	97,4	86,8–99,5
Negativer prädiktiver Wert (NPV)		101/103	98,1	93,1–99,5
		Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB TOXINE A & B		
REFERENZMETHODE: ELISA		POS	NEG	GESAMT
POSITIV*		35	2	37
NEGATIV		0	101	101
Gesamt		35	103	138
			%	KI 95 %
Klinische Sensitivität – Positive Übereinstimmung		36/38	94,6	82,3–98,5
Klinische Spezifität – Negative Übereinstimmung		101/101	100	94,3–100
Positiver prädiktiver Wert (PPV)		35/35	100	90–100
Negativer prädiktiver Wert (NPV)		101/103	98,1	93,2–99,5

*POSITIVE ERGEBNISSE bestätigt durch CCTNA (Zell-Zytotoxizitäts- und Neutralisierungstest)

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde folgendermaßen ermittelt:

- Test auf GDH: Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden zwei verschiedene Präparationen von der Glutamat-Dehydrogenase (nativ und rekombinant) von *C. difficile* verwendet. Mit beiden Präparationen wurde ein Mittelwert von 0,8 ng/mL erzielt.
- Test auf TOX A&B: Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden die Toxine A und B aus unterschiedlichen Quellen (List Biological Laboratories, tgc BIOMiCs und The Native Antigen) verwendet. Für das Toxin A ergab sich ein Mittelwert von 12,5 ng/mL, für das Toxin B ein Mittelwert von 1,5 ng/mL.

Die untere Nachweisgrenze des Tests wurde zudem unter Verwendung echter Stuhlproben als Matrix ermittelt. Die Werte waren mit den oben beschriebenen konsistent.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit des Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Tests wurde unter Verwendung einer einzigen Assay-Charge ermittelt.

PRÄZISION ZWISCHEN TAGEN

Zur Messung der Präzision zwischen verschiedenen Tagen wurden für jedes Analyt Verdünnungsreihen (Sensitivitätskurven) hergestellt. Sie wurden an vier Tagen vom gleichen Anwender getestet, wobei sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 100 % ergab.

PRÄZISION ZWISCHEN ANWENDERN

Zur Ermittlung der Präzision zwischen Anwendern wurden für jedes Analyt Verdünnungsreihen hergestellt und in doppelter Ausführung durch fünf Anwender am selben Tag getestet. Es wurden Abweichungen beobachtet, keiner dieser Fälle überschritt jedoch eine zweifache Verdünnung. Die Abweichungen wurden für eine qualitative immunochromatographische Methode als akzeptabel betrachtet.

Unter Verwendung von Assays einer Charge wurde an vier aufeinander folgenden Tagen für jedes Analyt eine Sensitivitätskurve gemessen. Die Sensitivität für GDH sowie für die Toxine A und B war dabei identisch.

PRÄZISION ZWISCHEN ANWENDERN:

Fünf Bediener maßen für jedes Analyt eine Sensitivitätskurve in doppelter Ausführung. Es wurden Abweichungen beobachtet, keiner dieser Fälle überschritt jedoch eine zweifache Verdünnung.

PRÄZISION ZWISCHEN CHARGEN:

Es wurden drei unterschiedliche Chargen des Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Tests herangezogen, um eine Sensitivitätskurve in doppelter Ausführung zu messen. Eine einzige Person führte die Analysen am selben Tag durch. Es wurden Unterschiede um einen Verdünnungsfaktor von 2 beobachtet, was für diesen Test akzeptabel und tolerierbar ist.

Die Unterschiede in den Bereichen „Reproduzierbarkeit“ sind für eine qualitative immunochromatographische Methode akzeptabel, der stets eine gewisse Variabilität innewohnt.

PROZONEN-/HOOK-EFFEKT

Die drei durch den Assay nachgewiesenen Analyte wurden in sehr hohen Konzentrationen getestet, ohne dass eine abnehmende Intensität der positiven Signale beobachtet worden wäre. Diese Konzentrationswerte (höher als die in der Population zu findenden Maximalwerte) waren:

- GDH: 4000 ng/mL, um mehr als das 1000-fache über der Nachweisgrenze des Assays.
- Toxin A: 5000 ng/mL, um mehr als das 400-fache über der Nachweisgrenze des Assays.
- Toxin B: 5000 ng/mL, um mehr als das 1500-fache über der Nachweisgrenze des Assays.

STÖRSUBSTANZEN

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Substanzen hatten keinerlei Auswirkungen auf die Testergebnisse, wenn sie Stuhlproben (positiven und negativen) in der angegebenen Konzentration hinzugefügt wurden:

Racecadotril	5 % (w/v)	Ibuprofen	20 % (w/v)
Cimetidin	10 % (w/v)	Acetylsalicylsäure	30 % (w/v)
Loperamid	5 % (w/v)	Künstlicher Süßstoff	5 % (w/v)
Metronidazol	10 % (w/v)	Palmitinsäure	40 % (w/v)
Omeprazol	3 % (w/v)	Bariumsulfat	5 % (w/v)
Ampicillin	15 % (w/v)	Muzin	5 % (w/v)

KREUZREAKTIVITÄT

Die Kreuzreaktivität des Assays wurde für verschiedene Bakterien evaluiert, die im Verdauungstrakt vorhanden sein können.

Dabei wurden mit dem Assay echte Stuhlproben analysiert, für die bereits ein stark positives Ergebnis für die folgenden Bakterien/Viren und Parasiten vorlag: Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - *Helicobacter pylori* - *Entamoeba histolytica* – *Giardia lamblia* - *Cryptosporidium parvum*

Bei Stuhlproben, die *Entamoeba histolytica* enthielten, wurde eine Kreuzreaktion festgestellt. Wenn der Test auf den isolierten Parasiten angewendet wird (ohne Stuhlmatrix), lässt sich keine Kreuzreaktion nachweisen. *Weitere Informationen finden Sie unter „Einschränkungen“, Punkt 9.*

Außerdem reagierten mit den folgenden mikrobiellen Erregern inokulierte Stuhlproben (auf eine endgültige Konzentration von $\sim 1 \times 10^8$ Organismen/ml in der Probe) nicht mit dem Assay:

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

Zusätzliche Informationen zu den Leistungsmerkmalen dieses Produkts erhalten Sie vom technischen Kundendienst von Meridian unter der nachfolgend genannten Adresse.

REFERENCES

1. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyerly DM, Popoff MR, Rood JI, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD and von Eichel-Streiber C. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol 2005 Feb 54(2):113-117.
2. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. Costs of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhoea. J Hosp Infect 2008 Sep 70(1):15-20.
3. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature 2010 Oct 467(7316):711-713.
4. Shetty N, Wren MW, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. J Hosp Infect 2011 Jan 77(1):1-6.
5. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2010 May 31(5):431-55.
6. Wilcox MH, Planché T, Fang FC and Gilligan P. What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2010 Dec 48(12):4347-53.
7. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R and Shetty NR. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. Br J Biomed Sci 2009;66 (1):1-5.
8. Crobach MJ, Planché T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2016 Aug 22(Suppl 4):S63-81.



SN750520IFU

REV 11/18



Manufactured By

Meridian Bioscience Europe S.r.l.
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese, Milano
ITALY

Tel: +39 0331 43 36 36

Fax: +39 0331 43 36 16

Email: info@meridianbioscience.eu

WEB: www.meridianbioscience.com/eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusqu'à / Fecha de caducidad / Verwendbar bis		Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung		Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum		Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Beauftragter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfils the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sul dispositivo medico-diagnostico in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In-Vitro-Diagnostika 98/79/EG		Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Apparat pour Préparation de l'échantillon avec Diluente de l'échantillon / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten		Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricatore / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Solamente per valutazione delle prestazioni / Reactif IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for "n" tests / Contienuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para "n" ensayos / Inhalt ausreichend für "n" Prüfungen		Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stoppflüssung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Límite de temperatura / Temperaturbegrenzung		Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Coniugé enzymatique / Coniugado enzimático / Enzymkonjugat
	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Numero de serie / Seriennummer		Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgerät		Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
	Conjugate / Coniugato / Coniugé / Coniugado / Konjugat		Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat		Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentrierte Waschpufferkonzentration
	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig		Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagent
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use if el paquete está dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist		Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß